

ISOLIERUNG DES ISOENZYMES
DER PHOSPHORYLASE KINASE
AUS ROTEM KANINCHENSKELETTMUSKEL
CHARAKTERISIERUNG UND VERGLEICH
DER REGULATION DURCH
 Ca^{2+} , Mg^{2+} , IONENSTÄRKE UND SUBSTRATE
MIT DEM ISOENZYM AUS
GEMISCHTEM KANINCHENSKELETTMUSKEL

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
HENNING NAUMANN
aus Leipzig

1983



Isolierung des Isoenzyms der Phosphorylase Kinase
aus rotem Kaninchenskelettmuskel
Charakterisierung und Vergleich der Regulation durch
 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ionenstärke und Substrate
mit dem Isoenzym aus gemischtem Kaninchenskelettmuskel

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
HENNING NAUMANN
aus Leipzig

1983

Meinen Eltern

Danksagungen

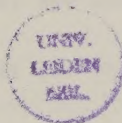
Für das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit
bin ich zu besonderem Dank verpflichtet

Herrn Prof. Dr. L.M.G. Heilmeyer jr. für die
Überlassung des Themas, die Bereitstellung des
Arbeitsplatzes und für die engagierte Anleitung
und Betreuung beim Anfertigen dieser Arbeit

Herrn Prof. Dr. H.P. Jennissen für die ständige
Bereitschaft zur kritischen Diskussion, die
wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beige-
tragen hat

Herrn Prof. Dr. Pongs
für die Übernahme des Korreferates

und allen Mitarbeitern unseres Hauses, die durch
ihre Unterstützung am Gelingen dieser Arbeit
mitwirkten



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Methodik	6
2.1 Präparative Methoden	6
2.1.1 Präparation der Phosphorylase Kinase aus gemischtem Muskel	6
2.1.2 Präparation der Phosphorylase b	7
2.1.3 Präparation von Calmodulin aus Rinder- hoden	9
2.1.4 Darstellung von AMP-freier Phosphorylase b	11
2.1.5 Darstellung von AMP-freiem Glycogen	11
2.1.6 Darstellung von ATP- γ - ^{32}P	12
2.1.7 Präparation der Phosphorylase a	12
2.1.8 Herstellung von Methylaminsubstituierter Sepharose 4 B	13
2.1.9 Herstellung von Calmodulin-Sepharose 4 B	14
2.1.10 Herstellung von Fluphenazin-Sepharose 4 B	15
2.1.11 Arbeitsweise unter Kontrolle der Calcium- konzentration	16
2.1.12 Autokatalytische Phosphorylierung der Phosphorylase Kinase	16
2.2 Analytische Methoden	18
2.2.1 Messung der Aktivität der Phosphorylase Kinase im Handtest	18
2.2.2 Messung der Aktivität der Phosphorylase Kinase im Autoanalyzer	19
2.2.3 Messung der Aktivität der Phosphorylase b im Autoanalyzer	20
2.2.4 Messung der Aktivität der Phosphorylase Phosphatase	20
2.2.5 Messung der Aktivität der Myosin-Light- Chain-Kinase	21

	Seite
2.2.6	Messung des Einbaus von ^{32}P in Protein 21
2.2.7	Messung der Proteinkonzentration nach Lowry 22
2.2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Weber und Osborn 22
2.2.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Cohen 23
2.2.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Portio und Pearson 23
2.2.11	Quantitative Auswertung von SDS-Elektrophoresegelelen 23
2.2.12	Messung der Calciumkonzentration mit dem Atomabsorptionsspektrometer 23
2.3	Berechnungen 25
2.3.1	Programm COMICS 25
2.3.2	Programm HYPER 26
2.3.3	Programm FIT 27
2.3.4	Programm ASSAM 27
2.3.5	Programm PFRAME 29
3.	Ergebnisse 30
3.1	Vorversuche zur Charakterisierung des Verhaltens von Phosphorylase Kinase auf der Calmodulin-Sepharose 30
3.1.1	Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sepharose 30
3.1.2	Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sepharose mit einem Calcium-Gradienten 34
3.1.3	Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sepharose - Elutionsverhalten in Abhängigkeit von der Salzkonzentration - 35
3.1.4	Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sepharose mit autophosphorylierter Phosphorylase Kinase 38

	Seite
3.1.5 Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sepharose - Test auf Phosphorylase Phosphatase und Myosin-Light-Chain-Kinase -	41
3.2 Reinigung des Isoenzyms der Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel	43
3.2.1 Präparation	43
3.2.2 Charakterisierung des gereinigten Isoenzyms der Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel durch Elektrophorese in Gegenwart von SDS	49
3.2.3 Charakterisierung des gereinigten Isoenzyms aus rotem Muskel : Zeit-Umsatz-Abhängigkeit in Bezug auf das Substrat Phosphorylase b	51
3.3 Vergleich der Isoenzyme der Phosphorylase Kinase - kinetische Messungen -	54
3.3.1 Abhängigkeit der Isoenzyme von der Calciumkonzentration	54
3.3.2 Vergleich der Aktivität der Isoenzyme bei steigendem Magnesiumionengehalt mit Ausgleich der Ionenstärke	58
3.3.3 Vergleich der Aktivität der Isoenzyme bei steigender Magnesiumkonzentration ohne Ausgleich der Ionenstärke	62
3.3.4 Vergleich der Isoenzyme bei steigender Ammoniumionenkonzentration	66
3.3.5 Abhängigkeit der Aktivität der Isoenzyme von ATP/Mg ²⁺	70
3.3.6 Abhängigkeit der Aktivität der Isoenzyme von dem Substrat Phosphorylase b	73
3.3.6.1 Vergleich der calciumabhängigen Partialaktivitäten bei 0.6 mM Mg ²⁺	73
3.3.6.2 Vergleich der calciumabhängigen Partialaktivitäten bei 1.6 mM Mg ²⁺	77

	Seite
3.3.6.3 Vergleich der calciumabhängigen Partialaktivitäten bei 14 mM Mg ²⁺	81
3.3.7 Aktivierung der Isoenzyme durch Calmodulin in Abhängigkeit der Calmodulinkonzentration	85
4. Diskussion	89
5. Zusammenfassung	108
6. Literaturverzeichnis	111
7. Anhang	116

Abkürzungen

Folgende Abkürzungen wurden zusätzlich zu den von der IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature (veröffentlicht in Eur. J. Biochem., 1, 259) empfohlenen verwendet:

cAMP	cyclisches 3', 5'- Adenosinmonophosphat
Ci	Curie
DTE	1,4-Dithioerythrit
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGTA	Äthylenglycol-bis-(-Aminoäthyläther)-N,N'-tetraessigsäure
GP	Natrium- β -Glycerophosphat
K_i	Inhibitorkonstante
K'_i	apparente Inhibitorkonstante
K_m	Michaeliskonstante
K'_m	apparente Michaeliskonstante
K_a	Assoziationskonstante
ME	β -Mercaptoäthanol
OD	Optische Dichte
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit

1. Einleitung

Skelettmuskel besteht aus quergestreiften weißen oder roten Muskelfasern, die entweder gemischt oder auch ausschließlich in einem Muskel vorkommen können. Weiße Muskeln kontrahieren schnell und kurzzeitig, rote dagegen langsam und anhaltend. Demnach bestehen die Muskeln, die kurzzeitige Hochleistungen erbringen müssen, aus weißen und die, die ausdauernde Leistungen schaffen, aus roten Muskelfasern.

Da der überwiegende Anteil der Muskeln beide Leistungsformen ausführen muß, enthalten die meisten Muskeln ein Gemisch beider Fasertypen.

Entsprechend der physiologischen Funktion besteht der chemische Unterschied beider Fasertypen nicht nur im Myoglobingehalt, der den roten Fasern die Färbung verleiht, sondern vor allem auch in unterschiedlichen Gehalten an Enzymen, die die Stoffwechselwege der Energieversorgung katalysieren. Während weiße Muskeln sich hauptsächlich des Glycogens als Energiespeicher bedienen und dementsprechend eine hohe Konzentration an Enzymen des Glycogenstoffwechsels und der Glycolyse (z.B. Phosphorylase, Phosphorylase Kinase, Lactatdehydrogenase, Triosephosphatdehydrogenase) besitzen, benutzt roter Muskel Fettsäureabbau zur Energieversorgung und besitzt unter anderem dementsprechend eine hohe Konzentration an Enzymen des Fettsäurestoffwechsels (z.B. Citratsynthase, 3-Hydroxyacyl-CoA - Dehydrogenase) (1) .

Enzyme gleicher Funktion im roten wie im weißen Muskel haben häufig eine unterschiedliche Struktur (z.B. Lactatdehydrogenase, Myosin (2), Phosphorylase Kinase (3)).

Ein Vergleich der Eigenschaften solcher Isoenzyme wurde vielfach benutzt, um die physiologischen Besonderheiten der verschiedenen Fasertypen zu erklären. Dies gelingt nur bei einfachen Enzymen und auch nur in beschränktem Maße, wie z.B. der Lactatdehydrogenase. Bei einem komplexen Enzym, wie z.B. bei der Phosphorylase Kinase, das mehrere Partialaktivitäten ausdrücken kann und das sowohl durch kovalente Modifikation als auch durch eine Reihe allosterischer Effektoren reguliert werden kann, ist ein Rückschluß auf die Situation in der intakten Zelle nicht ohne weiteres möglich.

Umgekehrt sollte es aber vielleicht möglich sein, durch Vergleich der Eigenschaften beider Isoenzyme auf die wesentlichen katalytischen Potenzen dieses Enzyms zu schließen, da diese in beiden Enzymen gleich sein sollten. Aus diesem Grund wurden von uns in der vorliegenden Arbeit die Isoenzyme der Phosphorylase Kinase untersucht.

Phosphorylase Kinase (E. C. 2. 7. 38) phosphoryliert die ohne AMP inaktive, dimere Phosphorylase b, wobei aktive, tetramere Phosphorylase a gebildet wird (4). Phosphorylase a spaltet die 1,4-glycosidische Bindung im Glycogen und setzt Glucose-1-phosphat frei. Das Glucose-1-phosphat wird in der Glycolyse abgebaut und liefert dabei ATP, das für die Myosin-ATP-ase zur Kontraktion des Muskels gebraucht wird. Dieser Zusammenhang zeigt die zentrale Stellung der Phosphorylase Kinase im Glycogenstoffwechsel in Bezug auf die Muskelkontraktion (5).

Phosphorylase Kinase kommt daher in allen Muskelfasertypen vor. Sie ist in den weißen (3), roten (3), Herz- (6) und glatten (7) Muskelfasern nachgewiesen worden. Ebenso aber auch im bedeutendsten Glycogenspeicher eines Organismus, der Leber (8), sowie in Blutplättchen (9), im Hirngewebe (10) und im Fettgewebe (11). Phosphorylase Kinase aus weißem Muskel ist aus vier heterologen Untereinheiten aufgebaut, genannt α , β , γ und δ , die einen tetrameren Komplex (α , β , γ , δ)₄ bilden (12, 13). Das Enzym aus roter Muskelfaser oder aus Herzmuskel enthält anstelle der Untereinheit α , die Untereinheit α' , die ein etwas geringeres Molekulargewicht als α aufweist (3). Das Molekulargewicht des tetrameren Komplexes beträgt 1 280 000 (3). Die Molekulargewichte der Untereinheiten wurden unterschiedlich bestimmt: α = 136 000 - 145 000, α' = 133 000 - 140 000, β = 117 000 - 130 000, γ = 42 000 - 45 000 (3, 13) und δ = 16 800 (14).

Die Funktion der einzelnen Untereinheiten ist nur in groben Zügen sichtbar. Die δ -Untereinheit entspricht dem Calmodulin (14), einem Calciumionen-bindenden Protein, und verleiht der Phosphorylase Kinase die Calciumsensitivität. Es kann bis zu sechs Mol Calcium pro Mol δ -Untereinheit binden, erfährt dadurch eine Konformationsänderung (15) und teilt dieses Signal den

katalytischen Zentren der Phosphorylase Kinase mit. Die Calciumbindung wird durch Magnesiumionen, die Ionenstärke und den pH beeinflusst (16).

Die γ -Untereinheit hat Ähnlichkeit mit dem Aktinmolekül (17). Sie wird als Träger eines aktiven Zentrums der Phosphorylase Kinase angesehen und konnte als δ -bindende Untereinheit charakterisiert werden (18).

Die β -Untereinheit wird ebenfalls als Träger eines aktiven Zentrums angesehen, da sie ATP bindet (19).

Die α - bzw. α' -Untereinheit kann ein zweites Molekül Calmodulin binden (20) und für sie wird daher eine regulative Funktion diskutiert (21). Die α - bzw. α' -Untereinheit kann zusammen mit der β -Untereinheit durch die cAMP-abhängige Proteinkinase und durch die Phosphorylase Kinase selbst (5 , 16) (Autophosphorylierung) phosphoryliert werden, die dadurch um mehr als das 10-fache aktiviert wird. Durch eine Protein Phosphatase kann das Phosphat aus den Untereinheiten wieder ausgebaut und die Aktivität dementsprechend wieder herabgesetzt werden (22).

Phosphorylase Kinase kann nicht nur Phosphorylase b als Substrat annehmen, sie phosphoryliert ebenso Glycogen Synthase, den Antagonisten der Phosphorylase a, die durch Phosphorylierung gehemmt wird. Als Folge stagniert der Aufbau des Glycogens und der Glycogenabbau wird bevorzugt (23). Von den drei Untereinheiten des Tropomyosins, TnT, TnI und TnC (24), kann Phosphorylase Kinase TnT und TnI phosphorylieren (25). Die physiologische Bedeutung dieser Phosphorylierungen wird noch diskutiert. Das Troponin selbst kann die autokatalytische Phosphorylierung der Phosphorylase Kinase beschleunigen (25).

Die Aktivität der Phosphorylase Kinase wird in vielfältiger Weise reguliert. Auf Grund des Ausflusses von Calciumionen aus den terminalen Cisternen des sarkoplasmatischen Retikulums erhöht sich die Calciumionenkonzentration in der Muskelzelle während der Kontraktion von ca. $5 \times 10^{-7} \text{M}$ auf 10^{-6} bis 10^{-5}M (26). Das führt zur Bindung von Calcium an die δ -Untereinheit, wodurch die Phosphorylase Kinase aktiviert wird. Isolierte Phosphorylase Kinase exprimiert zwei Calcium-abhängige

und eine Calcium-unabhängige Partialaktivität (16) :

Die Calcium-unabhängige Aktivität wird unterhalb von nM Ca^{2+} -Konzentrationen beobachtet und wird A_0 genannt.

Ca^{2+} -Konzentrationen im μM Bereich stimulieren die Phosphorylase Kinase bei pH 6.8 fünf- bis zehnfach, sie drückt dann die A_1 -Aktivität aus.

Bei pH 8.6 und 0.1 mM Calcium wird die dritte Partialaktivität A_2 maximal stimuliert.

Alle drei Partialaktivitäten können durch Magnesium beeinflusst werden (16). Das Magnesiumion ist mit seinem Ionenradius von 0.65 Å etwa ein Drittel kleiner als das Ca^{2+} -Ion (0.99 Å) (27). Zum einen ist die Bindung von Ca^{2+} an die Ca^{2+} -spezifischen Seiten des Calmodulins nur in Gegenwart von Mg^{2+} möglich, zum anderen kompetiert es mit Ca^{2+} an den Ca^{2+}/Mg^{2+} -Seiten (15 , 16). Diese Kompetition beeinflusst hauptsächlich die A_1 -Aktivität (28), die A_0 -Aktivität wird kaum verändert (16).

Die Phosphorylase Kinase kann zusätzlich Calmodulin (s.o.) und ausserdem Glycogen binden (29) . Der Bindung folgt eine Stimulierung der Aktivität der Phosphorylase Kinase, deren Mechanismus noch unbekannt ist. Beide können nur in Anwesenheit von Calcium- und Magnesiumionen an die Phosphorylase Kinase binden. Steiner und Marshall (30) postulieren, daß die Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, die die Muskelkontraktion auslöst, simultan die Bindung der Phosphorylase Kinase an Glycogen bzw. Calmodulin und dadurch eine Aktivierung des Enzyms bewirkt.

Alle diese oben beschriebenen Eigenschaften der Phosphorylase Kinase wurden für das Isoenzym aus weißem bzw. gemischtem Muskel beschrieben. Über das Isoenzym der Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel ist noch nicht viel bekannt. Jennissen und Heilmeyer (3) stellten als erste fest, daß die α' -Untereinheit dem Isoenzym aus rotem Muskel zuzuordnen ist. Erste kinetische Messungen wurden von Dickneite (31) an einem partiell gereinigten Enzym ausgeführt. Diese Messungen sind aber nur schwer interpretierbar, da die Produktbildung nicht zeitlinear erfolgte.

Kürzlich reinigten Wang et al. (32) das rote Isoenzym aus Rindermuskel. Sie stellten fest, daß die Phosphorylierung des Isoenzyms durch sich selbst (Autophosphorylierung) und durch die

cAMP-abhängige Proteinkinase wie beim weißen Isoenzym an der α' - und β -Untereinheit erfolgt und daß dadurch die Aktivität stimuliert wird. Weiter zeigt die Aktivität, wie beim weißen Isoenzym (16), ein Maximum zwischen pH 8 und pH 9.

Das Isoenzym der Phosphorylase Kinase aus Herzmuskel wurde von Cooper et al. (6) und Killilea et al. (33) gereinigt. Es entspricht dem Isoenzym aus rotem Muskel, da es auch die α' -Untereinheit statt der α -Untereinheit besitzt. Cooper konnte im Gegensatz zu Killilea keine δ -Untereinheit finden. Hauptsächlich wurde wieder die Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase und durch sich selbst untersucht. Sie erfolgt, wie beim Isoenzym aus weißem und rotem Muskel, an der α' - und β -Untereinheit. Die Aktivität des Herzmuskelenzyms hat ein pH-Optimum zwischen pH 8 und pH 9 (6) und das unphosphorylierte Enzym besitzt bei pH 6.8 einen K_a -Wert für Calcium von 1.94 μ M. Der K_m -Wert für ATP ist bei pH 8.2 abhängig von der Phosphorylase b-Konzentration und bewegt sich zwischen 0.14 und 0.22 mM ATP (6).

Die vorliegenden Daten über Isoenzyme aus roten Muskeln sind mit den Daten der Isoenzyme aus weißen Muskeln nicht vergleichbar; zum einen werden die roten Isoenzyme aus anderen Tierspezies isoliert, zum anderen wurde ein nicht typischer roter Muskel (Herzmuskel) verwendet. Weiterhin fehlen Daten über die Partialaktivitäten des roten Isozyms.

Um einen derartigen Vergleich, wie oben beschrieben, durchführen zu können, muß deshalb Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel vollständig gereinigt werden.

Durch eingehende Untersuchungen im Hinblick auf die Regulation durch Calcium und Magnesium und auf die Substrate sollen im direkten Vergleich die Unterschiede zwischen den beiden Isoenzymen aus rotem und weißem Kaninchenmuskel herausgearbeitet werden.

2. Methodik

2.1 Präparative Methoden

2.1.1 Präparation der Phosphorylase Kinase aus gemischtem Muskel nach Cohen (13) modifiziert nach Jennissen und Heilmeyer (34).

Es werden etwa 8 Kaninchen mit einer letalen Dosis Evipan getötet, abgehäutet und das Fleisch vom Skelett gelöst und sofort auf Eis gelegt. Dann wird das Fleisch durch den Wolf gedreht. Alle weiteren Schritte werden von nun an im Kühlraumoder auf Eis ausgeführt, wenn nicht anders angegeben.

EXTRAKTION : Der Fleischbrei wird mit der 2.5 fachen Gewichtsmenge Puffer (4 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 9.0) versetzt und im Waring-Homogenisator 45 Sekunden lang homogenisiert. Der viskose Brei sollte nun einen pH von ca. 6.8 haben; er wird bei 13 000 x g 25 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wird über Glaswolle abfiltriert.

SÄUREFÄLLUNG : Der Rohextrakt wird langsam mit 1 M Essigsäure versetzt, bis der pH-Wert bei ca. 6.0 liegt. Das Optimum der Fällung erkennt man daran, daß die Zahlen einer mit der Suspension gefüllten 20-ml Pipette von der Rückseite her nicht mehr zu sehen sind. Die Säurefällung sollte nicht länger als 15 Minuten stehen; sie wird dann 25 Minuten lang bei 13 000 x g zentrifugiert.

ULTRAZENTRIFUGATION : Der Überstand wird verworfen und das Sediment sofort mit dem etwa gleichen Volumen (5 ml) 0.1 M GP, 4 mM EDTA, 20 mM ME, 0.02 % NaN_3 , pH 8.0 neutralisiert. Anschließend wird es in einem Potter-Homogenisator in maximal 400 ml 50 mM GP, 2 mM EDTA, 20 mM ME, 0.02 % NaN_3 , pH 7.0 homogenisiert. Die Suspension wird anschließend 100 Minuten bei 110 000 x g zentrifugiert, der Überstand wird durch Glaswolle filtriert.

AMMONIUMSULFATFÄLLUNG : Der 110 000 x g - Überstand wird mit dem 0.52 - fachen seines Volumens an 3.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7.0 versetzt und nach 10 minütigem Stehen wird die Fällung mit 12 000 x g zentrifugiert. Das Sediment wird in ca. 30 ml 100 mM GP, 2 mM EDTA, 20 mM ME, 0.02 % NaN_3 , pH 7.0 aufgeschlemmt und dann 1 Stunde lang

gegen den obigen Puffer dialysiert. Danach wird die Lösung 10 Minuten bei 27 000 x g zentrifugiert.

GELFILTRATION : Der Überstand (ca. 50 ml) wird auf eine Sepharose-4B-Säule mit 3 l Inhalt aufgetragen, die mit Puffer s.o. äquilibriert ist. Die Säule wird über Nacht mit ca. 3 l des obigen Puffers eluiert (Durchflußgeschwindigkeit ca. 450 ml/h, Fraktionsvolumen 14.5 ml). Man beobachtet drei bei 280 nm absorbierende Proteingipfel. Jede dritte Fraktion des mittleren Gipfels wird auf Phosphorylase Kinase Aktivität untersucht und die Aktivität enthaltenden Fraktionen werden vereinigt.

IONENAUSTAUSCH-CHROMATOGRAPHIE : Die vereinigten Fraktionen werden auf eine DEAE-Cellulose-Säule von ca. 360 ml Inhalt aufgepumpt, die ebenfalls mit dem Puffer s.o. äquilibriert ist. Nach dem Waschen mit eben diesem Puffer, wird ein linear ansteigender NaCl-Gradient angelegt. Die Kinase wird bei ca. 200 mM NaCl eluiert, was durch einen bei 280 nm absorbierenden Gipfel angezeigt wird. Jede dritte Fraktion dieses Gipfels wird mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Cohen (13) untersucht. Die Fraktionen, deren SDS-Gel nur die vier Banden der Phosphorylase-Kinase-Untereinheiten zeigen, werden vereinigt.

ANKONZENTRATION : Die Lösung wird mit dem 0.52-fachen ihres Volumens an 3.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0 versetzt, 10 Minuten stehen gelassen und dann 15 Minuten bei 12 000 x g zentrifugiert. Das Sediment wird nun in soviel Puffer s.o. aufgenommen, daß eine Proteinkonzentration von ca. 5 mg/ml erreicht wird. Zuletzt wird die Kinase etwa 2 Stunden gegen den gleichen Puffer dialysiert, um das Ammoniumsulfat zu entfernen, und dann bei -20° C gelagert.

2.1.2 Präparation der Phosphorylase b (35)

3 kg Kaninchenskelettmuskel, der in Portionen zu je ca. 500 g in Plastikbeuteln eingefroren wurde, werden in heißem Wasser aufgetaut (30 - 40° C), bis die äussere Schicht weich ist. Dann wird das Fleisch den Beuteln entnommen und im Kühlraum durch den Fleischwolf gedreht.

EXTRAKTION : Der so entstandene Brei wird mit der gleichen Gewichtsmenge destilliertem Wasser verrührt und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur extrahiert. Anschließend wird er durch eine vierfache Lage Gaze gepreßt. Der Extrakt wird aufgefangen und auf

Eis gestellt. Der Fleischbrei wird nun wieder im gleichen Volumen Wasser aufgerührt, 10 Minuten lang extrahiert und wieder durch eine vierfache Lage Mull ausgepreßt. Die Extrakte werden zusammengegeben. Das ausgepreßte Fleisch wird noch einmal im halben Volumen aufgerührt, 5 Minuten lang extrahiert und durch Mull gepreßt. Die vereinigten Extrakte werden durch Glaswolle filtriert und auf Eis gegeben.

Sofern nichts anderes angegeben, werden alle folgenden Schritte bei 4° C oder auf Eis durchgeführt.

Der Rohextrakt wird in einen Dialyseschlauch gegeben und ca. 3 Stunden lang gegen das 10-fache Volumen dialysiert.

SÄUREFÄLLUNG : Mit 1 M Essigsäure wird der Rohextrakt auf pH 5.2 bis 5.3 eingestellt. Der entstandene Niederschlag wird sofort 20 Minuten lang bei 15 000 x g abzentrifugiert. Nachdem der Überstand über Glaswolle filtriert worden ist, wird durch Zugabe von festem KHCO_3 ein pH-Wert von 6.8 eingestellt.

AMMONIUMSULFATFÄLLUNG : Der Überstand wird nun mit festem Ammoniumsulfat (250 g/ l Überstand) versetzt. Der pH-Wert wird dabei laufend kontrolliert und mit konzentrierter Ammoniaklösung auf pH 7.0 gehalten. Die Fällung wird ca. 2 Stunden abgedeckt stehen gelassen und anschließend 30 Minuten bei 15 000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wird in 70 bis 100 ml destilliertem Wasser aufgenommen und in einem Potter-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wird 2 bis 3 Stunden gegen 5 l kaltes Wasser dialysiert und über Nacht gegen 5 l 1 mM Tris/HCl pH 7.0.

HITZESCHRITT : Das Dialysat wird mit 1/500 seines Volumens mit 14 M ME und 1/400 seines Volumens mit 0.2 M EDTA versetzt und mit 2 M Tris auf pH 8.8 eingestellt. Danach wird es im Wasserbad eine Stunde lang bei 37° C inkubiert, auf 4° C abgekühlt und der pH-Wert mit 1 M Essigsäure auf pH 7.0 eingestellt. Der entstandene Niederschlag wird 15 Minuten lang bei 30 000 x g abzentrifugiert.

UMKRISTALLISATION : Der Überstand wird mit 1/100 seines Volumens mit 1 M Magnesiumacetat, 1/100 seines Volumens mit 0.1 M AMP versetzt, mit Parafilm abgedeckt und über Nacht kristallisiert die Phosphorylase b im Kühlraum aus. Die entstandenen Kristalle der Phosphorylase b werden 15 Minuten lang bei 30 000 x g abzentrifugiert. Das Pellet bei Raumtemperatur in 20 mM ME, 10 mM Tris/

HCl pH 7.0 gelöst und homogenisiert. Diese Prozedur wird noch zweimal wiederholt. Ein eventueller Niederschlag von denaturiertem Protein wird abzentrifugiert. Die gelöste Phosphorylase b wird dann ca. 4 Stunden lang in 70 % Glycerin dialysiert und bei -20°C gelagert.

2.1.3 Präparation von Calmodulin aus Rinderhoden

Rinderhoden werden frisch vom Schlachthof geholt, von ihren Häuten befreit und in Plastikbeuteln eingefroren, um nach Bedarf aufgetaut zu werden. Alle Schritte werden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt.

EXTRAKTION : Zwei kg Rinderhoden werden in 5 l Puffer A (50 mM NaH_2PO_4 , 5 mM EDTA, pH 5.7) drei Minuten lang im Homogenisator (Waring-Blendor) homogenisiert. Der Brei wird bei 13 000 x g 30 Minuten lang zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand durch Glaswolle filtriert, das Pellet noch einmal 3 Minuten lang homogenisiert, wieder im 2.5-fachen des anfänglichen Gewichtes Puffer A, und noch einmal bei 13 000 x g 30 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird durch Glaswolle filtriert und mit dem ersten Überstand vereinigt.

TCA-FÄLLUNG : Zu den vereinigten Überständen wird 3 % des Gewichtes festes TCA zugegeben, nach 10-minütigem Rühren wird die Fällung mit konzentrierter NaOH auf pH 5.5 gebracht, dann 0.5 % des Volumens an 1 M EDTA Lösung zugegeben und eine Stunde lang bei 4°C gerührt. Die Fällung wird 30 Minuten bei 13 000 x g abzentrifugiert, der Überstand durch Glaswolle filtriert. Der Überstand wird nun wieder mit 3 % seines Gewichtes an festem TCA versetzt, 10 Minuten lang auf Eis gerührt und dann 20 Minuten bei 13 000 x g zentrifugiert. Das Sediment wird in ca. 300 ml 1 M Tris suspendiert, 0.5 % des Volumens 1 M EDTA zugegeben und auf pH 7.5 eingestellt.

AMMONIUMSULFATFÄLLUNG : Die Suspension wird mit 243 g/l Ammoniumsulfat versetzt, der pH sollte dabei ca. 7 behalten, und 30 Minuten lang stehen gelassen. Die Fällung wird anschließend bei 12 000 x g abzentrifugiert, das Sediment verworfen, der Überstand 2 mal gegen 5 l Puffer B (50 mM NaH_2PO_4 , 2 mM EDTA, pH 5.7)

dialysiert. Das Dialysat wird 50 Minuten lang bei 12 000 x g zentrifugiert, um denaturiertes Protein zu entfernen.

IONENAUSTAUSCH-CHROMATOGRAPHIE : Der Überstand wird auf eine 750 ml fassende DEAE-Cellulose-Säule aufgepumpt und mit Puffer B so lange gewaschen, bis kein Protein mehr zu beobachten ist, das bei 280 nm absorbiert. Anschließend wird mit 200 mM NaCl in Puffer B gewaschen, bis wieder kein Protein über den Monitor bei 280 nm nachzuweisen ist. Dann wird ein linearer Gradient von 200 bis 1000 mM NaCl angelegt (Flußgeschwindigkeit: 200 ml/h, Fraktionsvolumen: 14.5 ml, Dauer des Gradienten: 16 h). Das Elutionsprofil weist mehrere Proteingipfel aus, die auf Calmodulin untersucht werden, indem jede dritte Fraktion mittels SDS-Gelelektrophorese (10 %-ige SDS-Polyacrylamid-Gele nach Weber und Osborn) geprüft wird. Die Phosphorylase Kinase wird als Standard genommen, da die δ -Untereinheit dem Calmodulin entspricht. Es werden alle Fraktionen vereinigt, deren SDS-Gel eine deutliche Bande entsprechend der δ -Untereinheit zeigt. Die zusammengegebenen Fraktionen werden mit 3 Gew. % TCA (fest) versetzt, 10 Minuten auf Eis stehengelassen und 20 Minuten bei 12 000 x g zentrifugiert. Das Sediment wird in wenig Puffer C (20 mM Tris/HCl, 5 mM ME, pH 7.5) aufgenommen, der pH auf 7.5 nachgestellt, und über Nacht gegen zweimal 5 l Puffer C dialysiert.

FLUPHENAZIN-SEPHAROSE-4B-CHROMATOGRAPHIE (36): Das Dialysat wird auf 5 mM Ca^{2+} gebracht und auf 100 ml Fluphenazin-Sepharose-4B aufgepumpt. Die Fluphenazin-Sepharose-4B wird mit dem Puffer C + 5 mM CaCl_2 gewaschen, bis auf dem Monitor bei 280 nm keine Protein-elution mehr feststellbar ist. Anschließend wird mit Puffer C + 0.5 mM CaCl_2 + 500 mM NaCl nachgewaschen und schließlich mit Puffer C + 2 mM EGTA + 500 mM NaCl das Calmodulin spezifisch eluiert. Als Reinheitskriterium gilt der Quotient der Extinktionen von 277 nm und 251 nm, er sollte 1.75 betragen.

2.1.4 Darstellung von AMP-freier Phosphorylase b (37)

Da AMP die Phosphorylase b allosterisch aktiviert, sollte dieses vor Gebrauch entfernt werden. Die kristalline Phosphorylase b, die jetzt noch AMP enthält, wird 10 Minuten lang bei 30 000 x g abzentrifugiert und das Pellet in einem Volumen Puffer A (50 mM ME, 10 mM GP, pH 7.0) aufgenommen. Falls sich nicht alles löst, wird es bei 30° C im Wasserbad inkubiert, bis alles gelöst ist, eventuell wird noch etwas Puffer A zugegeben. Inzwischen wurde eine Chromatographiesäule mit einer ca. zwei cm dicken Schicht Cellulosepulver, das in Puffer A aufgeschwemmt wurde, und mit einer doppelt so dicken Schicht in Puffer A äquilibrierter Aktivkohle (1.6 x 30) vorbereitet. Anschließend wird die Säule mittels einer Pumpe mit Puffer A insgesamt äquilibriert, die Phosphorylase b aufgetragen und mit der obersten Schicht Aktivkohle vermischt, schließlich mit Hilfe der Pumpe und Puffer A eluiert. Das Eluat enthält die AMP-freie Phosphorylase b. Ein Maß für die Reinheit ist auf Grund der unterschiedlichen UV- Spektren der Phosphorylase b und des AMP der Quotient der Extinktionen von 260 nm und 280 nm gegeben, er sollte bei dem gereinigten Enzym 0.5 - 0.55 betragen, während das ungereinigte Enzym den Quotienten von 1.5 hat. Die Proteinkonzentration errechnet sich aus der Extinktion bei 280 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $1.30 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$.

2.1.5 Darstellung von AMP-freiem Glycogen

Wie oben schon erwähnt, aktiviert das AMP die Phosphorylase b, und da diese als Substrat im Phosphorylase Kinase Aktivitätstest eingesetzt werden soll, aber auch Glycogen im Ansatz vorhanden sein soll, ist es ratsam das Glycogen ebenfalls von AMP zu befreien. Dazu wird eine Prozedur von Helmreich et al. (38) verwendet. Vom Produkt wird eine 10 %-ige Lösung hergestellt, die noch einmal unter Wasserstrahlvakuum von Äther befreit (Geruchsprobe) und eingefroren wird.

2.1.6 Darstellung von ATP- γ - ^{32}P

Das ATP- γ - ^{32}P wird nach der Methode von Glynn und Chappel (39) hergestellt. Das Produkt enthält ca. 8 - 12 mM ATP- γ - ^{32}P , 150 - 300 Ci/Mol, 5 - 20 mM Mg^{2+} und 175 - 400 μM Ca^{2+} .

2.1.7 Präparation der Phosphorylase a (35)

Die mit ^{32}P markierte Phosphorylase a wird für den Test auf Phosphorylase Phosphatase benötigt. Zur Herstellung wird AMP-freie Phosphorylase b auf eine Konzentration von 25 mg/ml eingestellt. In den Reaktionsansatz werden dann pro mg Phosphorylase b 120 mM Magnesiumacetat, 40 mM ATP und 1 μCi ATP- γ - ^{32}P gegeben. Der pH-Wert wird mit 2 N Tris auf 8.2 eingestellt, und nach 10 Minuten vorinkubieren wird die Reaktion durch Zugabe von 3 μg Phosphorylase Kinase pro mg Phosphorylase b gestartet. Die Reaktion dauert ca. 30 Minuten bei 30° C und wird nach dieser Zeit durch Abkühlen auf 0° C gestoppt. Der Ansatz bleibt 15 Minuten lang auf Eis. Während dieser Zeit hat sich ein Niederschlag aus Phosphorylase a gebildet, der jetzt bei 30 000 x g 15 Minuten abzentrifugiert wird. Das Sediment wird in wenig Puffer (20 mM Tris/HCl, 20 mM ME, pH 7.0) gelöst und durch filtrieren über Aktivkohle, die vorher mit obigem Puffer äquilibriert wurde, vom ATP befreit (s.o.). Man läßt nun die Phosphorylase a 3 bis 4 Stunden auf Eis auskristallisieren und zentrifugiert die Kristallsuspension danach bei 30 000 x g 15 Minuten lang ab. Diesen Vorgang wiederholt man zweimal, löst das Sediment in wenig 10 mM Tris/HCl, 20 mM ME, pH 7.0 und zentrifugiert einen eventuell auftretenden Niederschlag von denaturiertem Protein bei 30 000 x g 15 Minuten lang ab. Die Phosphorylase a wird bei 0° C im Eisbad als kristalline Suspension gelagert.

2.1.8 Herstellung von Methylaminsubstituierter Sepharose 4 B (34 , 40)

50 g trockene Sepharose 4 B werden auf einem Büchnertrichter mit 2 l H_2O gewaschen und anschließend trockengesaugt. Die Sepharose wird in ein Becherglas gegeben und dazu 22 ml H_2O , 37.4 ml Dioxan und 48 ml 2.5 M Phosphatpuffer (1.8 M K_3PO_4 , 0.8 M K_2HPO_4 , pH 12.0) gegeben. Die Reaktion wird mit 2.6 ml BrCN-Lösung (846 mg/ml), die vorher jodometrisch überprüft worden ist, (Endkonzentration: 20 mg/ml) gestartet. Die Reaktion dauert 12 Minuten und während dieser Zeit sollte der pH bei 12 und die Temperatur sollte zwischen 5° C und 10° C bleiben. Nach den 12 Minuten wird der Ansatz sofort über einem Büchnertrichter abgesaugt und mit 1.5 l 100 mM GP, pH 7.0 nachgewaschen. Die Methylaminlösung (2 M) wird mit ^{14}C -Methylamin (0.25 $\mu Ci/ml$) markiert und auf pH 10.0 gebracht. Die aktivierte Sepharose wird dann sofort in 100 ml ^{14}C -markierte Methylamin-Lösung eingerührt, so daß der Vorgang des Waschens und des Einbringens in die Methylamin-Lösung höchstens 90 Sekunden dauert. Daraufhin wird die Sepharose im Kühlraum drei Stunden lang vorsichtig gerührt, anschließend über einem Büchnertrichter mit je 400 ml 0.01 M NaOH, 0.01 M HCl und bidestilliertem Wasser gewaschen. Schließlich wird die Methylsepharose in 10 mM GP, 0.01 % NaN_3 , pH 7.0 aufgenommen und im Kühlraum bei 4° C gelagert.

Der Substitutionsgrad der mit ^{14}C markierten Methylaminsepharose wird wie folgt bestimmt:

In einer kalibrierten Chromatographiesäule (5 ml Volumen) werden Proben der Methylaminsepharose zu etwa 1 ml abgemessen. Diese werden quantitativ in je ein Reagenzglas überführt und je 1 ml konzentrierte Salzsäure zugegeben. Die Salzsäure hydrolysiert das Gel innerhalb von 45 Minuten bei 50° C. Die entstandene klare Lösung wird nach dem Abkühlen mit 100 μl 20 N NaOH neutralisiert. Anschließend werden 1.5 ml der Probe in 18 ml Szintillationslösung (21.84 g 2,5 - Diphenyloxazol / 2.16 g 1,4-Di-(2-methylstyryl)- Benzol gelöst in 2 l Toluol und 1 l Triton-X 100) gelöst und im Flüssigkeits-Szintillationszähler

(Packard, Modell 2450) auf ^{14}C geprüft. Gleichzeitig mit den Proben werden drei unsubstituierte Proben der Sepharose 4 B abgemessen, mit 50 μl , 100 μl und 200 μl der ^{14}C -Methylamin-Lösung aus dem Ansatz versetzt, hydrolysiert, neutralisiert und ebenfalls auf ^{14}C geprüft. Diese Proben ergeben die Eichgerade, nach der der Einbau von Methylamin in die Sepharose 4 B berechnet wird.

2.1.9. Herstellung von Calmodulinsepharose 4 B (41)

AKTIVIERUNG : Die Sepharose 4 B wird im Büchnertrichter mit drei Volumen destilliertem Wasser gewaschen und bis zur Trockene abgesaugt. Nach Überführung in ein Becherglas, wird sie mit einem Volumen 0.5 M Na_2CO_3 , pH 11 versetzt. Unter Rühren wird nun 0.6 ml/10 g Sepharose 4 B Divinylsulfon langsam zugegeben und 70 - 75 Minuten lang gerührt (bei Zimmertemperatur). Jetzt werden alle 5 - 10 Minuten 30 μl /10 g Sepharose 4 B Divinylsulfon insgesamt siebenmal zugegeben. Anschließend wird die Sepharose 4 B bis zur Neutralität mit destilliertem Wasser, dann mit 1.5 Volumen destilliertem Aceton und schließlich mit 3 Volumen destilliertem Wasser mit 0.01 % NaN_3 gewaschen.

KOPPELUNG AN CALMODULIN : Die aktivierte Sepharose wird nun im Büchnertrichter mit zwei Volumen 0.2 M Na_2CO_3 gewaschen und in ein Becherglas überführt. Nach Zugabe von einem Volumen des obigen Puffers, wird das Calmodulin, das vorher in ebendiesem Puffer dialysiert worden ist, hinzugefügt, bei Zimmertemperatur sechs Stunden lang , dann 18 - 22 Stunden im Kühlraum bei 4°C gerührt. Danach wird die Reaktion mit 60 mg/10 g Sepharose Glycin gestoppt und vier Stunden lang bei 22°C gerührt. Die Suspension wird dann 15 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert, der Überstand abdekantiert, die Calmodulinsepharose in 0.02 % NaN_3 aufgenommen, in eine 5 cm $\varnothing$ Säule gegeben und so lange mit 0.02 % NaN_3 gewaschen, bis kein Protein mehr bei 280 nm nachzuweisen ist. Die Calmodulinsepharose kann im obigen Puffer mehrere Monate im Kühlraum gelagert werden.

2.1.10 Herstellung von Fluphenazinsepharose 4 B (36)

Das Fluphenazin wird nach einer Methode von Sairam und Porath (42) über einen Diglycidyläther an die Sepharose 4 B gebunden.

AKTIVIERUNG : Die Sepharose wird mit drei Volumen destilliertem Wasser auf einem Büchnertrichter gewaschen und trocken gesaugt. 100 g dieser Sepharose 4 B wird mit 100 ml 0.6 N NaOH mit 3 mg/ml NaBH_3 und 100 ml Diglycidyläther zusammengegeben und 8 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird das Gel mit sechs bis acht Litern destilliertem Wasser gewaschen und wieder abgesaugt. Sofort anschließend wird die Koppelung ausgeführt.

KOPPELUNG : Die so aktivierte Sepharose wird sofort mit 160 ml 0.1 M Na_2CO_3 , 404 mg Fluphenazin, pH 11.0 verrührt und unter leichtem Rühren auf 70° C erhitzt. Bei 70° C wird dann die Reaktionsmischung 48 Stunden lang inkubiert. Dann wird die Sepharose über einem Büchnertrichter mit ein bis zwei Litern Aceton gewaschen, um das nicht umgesetzte Fluphenazin zu entfernen. Nach dem Aceton wird ein Liter absoluter Alkohol zum Waschen genommen und während des Waschvorganges wird das Gel ca. 30 Minuten dem Alkohol ausgesetzt, um noch verbliebene freie Oxirangruppen mit dem Alkohol abreagieren zu lassen. Die Fluphenazinsepharose wird dann in 0.01 % NaN_3 -Lösung aufgenommen und kann so einige Monate ohne irgend welchen Verlust aufgehoben werden.

ACHTUNG : Das Fluphenazin ist photosensitiv, d.h., es sollte, soweit es geht, immer mit Aluminiumfolie abgedeckt und nur im Dunkeln aufgehoben werden !!

REGENERATION : Die Fluphenazinsepharose kann nach jedem Gebrauch regeneriert werden. Dazu wird die Sepharose mit drei Volumen 1.0 M NaCl, 10 mM EGTA, pH 8.5 gewaschen, dann mit drei Volumen Aceton und gleichviel destilliertem Wasser. Sie wird anschließend in 0.01 % NaN_3 aufgenommen und im Dunkeln gelagert.

2.1.11 Arbeitsweise unter Kontrolle der Calciumkonzentration

Um bei konstanten und kontrollierbaren Calciumkonzentrationen im nM bis μM Bereich arbeiten zu können, sind einige Vorsichtsmaßnahmen zu beachten.

1. Sämtliche Behälter und Röhrchen, in denen Lösungen mit definierten Calciumkonzentrationen enthalten sein sollen, werden folgender Prozedur unterworfen: 24 Stunden einweichen in 5 mM EGTA, pH 8.0, 6 Stunden einweichen in Millipore-Wasser (Ca^{2+} -Verunreinigung: 1 μM) und anschließend trocknen bei 40° C und 20 Torr Vakuum.
2. Kontrolle von allen Chemikalien auf Calcium-Verunreinigungen mittels der Atomabsorptionsspektroskopie.
3. Gebrauch von neuen Kunststoffpipettenspitzen, die zusätzlich vor Gebrauch mit etwa 1 μM Ca^{2+} enthaltendem Wasser durchgespült werden.
4. Behälter, Röhrchen und Pipettenspitzen wurden jeweils nur fabrikneu benutzt.
5. Alle Chemikalien werden nur mit dem Prädikat p.A. benutzt, NH_4Cl in "suprapur" eingesetzt.

Da das Calcium fast überall präsent ist, werden alle Lösungen vor Gebrauch mit der AAS auf Calcium kontrolliert und die Verunreinigungen entsprechend bei der Auswertung berücksichtigt. Da überwiegend mit EGTA-Puffern gearbeitet wird, kann man die Verunreinigungen bei der Berechnung der Calciumkonzentrationen entsprechend berücksichtigen.

2.1.12 Autokatalytische Phosphorylierung der Phosphorylase Kinase

Die Phosphorylase Kinase wird in den Puffer 10 mM GP, 0.4 mM EDTA, 0.2 mM DTE, 0.1 % Glycogen, 0.1 mM CaCl_2 , pH 7.5 überführt. Der Reaktionsansatz besteht aus: 10 μl ATP- γ - ^{32}P (ca. 10 mM) 10 μl ATP (50 mM), 40 μl Puffer pH 9.0 (.s.o.), 40 μl MgCl_2 (100 mM), 30 μl H_2O ; gestartet wird die Phosphorylierung mit 70 μl Phosphorylase Kinase (ca. 0.8 mg/ml). Der Ansatz wird

bis zu 30 Minuten lang inkubiert und jede 5 bis 10 Minuten eine Probe à 10 µl gezogen, die für den Aktivitätstest in je 1 ml 100 mM NH_4Cl , 1 mM GP, 0.75 mM DTE, 0.01 % NaN_3 , 5 mg/ml BSA, pH 6.8 bzw. 8.6 gestoppt wird. Kurz vorher und danach werden die Proben für den Phosphateinbau ins Protein und für die Gelelektrophorese entnommen.

2.2. Analytische Methoden

2.2.1. Messung der Aktivität der Phosphorylase Kinase im Handtest

Die Aktivitätsbestimmung im Handtest wird bevorzugt in der folgenden Arbeit angewandt, da er eine hohe Genauigkeit und gut kontrollierbare Bedingungen bietet. Im folgenden wird immer bei konstanten und kontrollierten Ca^{2+} -Konzentrationen gearbeitet. (Siehe 2.1.11)

Der Ansatz enthält 50 μl Phosphorylase b (15 mg/ml)
50 μl ATP / Mg^{2+} (18 mM / 18 mM)
25 μl Handtestpuffer (wird dem jeweiligen Versuch angepaßt)
25 μl Phosphorylase Kinase

Gestartet wird mit der Phosphorylase Kinase, Proben à 10 μl werden nach 1, 3, 6, 9, 12 Minuten gezogen und in 490 μl eiskaltem Stop-Puffer (100 mM Na-Maleat, 100 mM NaF, 3 mM EDTA, 40 mM ME, 1 mg/ml Rinderserumalbumin, pH 7.0) verdünnt. Die im Test gebildete Phosphorylase a wird sofort im automatischen Test (s.u.) auf ihre Aktivität geprüft. Diese ist proportional zur Menge der gebildeten Phosphorylase a. Die Aktivität der Kinase wird in Einheiten pro mg Phosphorylase Kinase angegeben. Eine Einheit ist definiert als 1 μM Phosphat, das auf die Phosphorylase b pro mg und Minute übertragen wird. Das auf die Phosphorylase b übertragene Phosphat wird aus der bekannten spezifischen Aktivität der gebildeten Phosphorylase a und der gemessenen Aktivität der Phosphorylase a nach folgender Beziehung ermittelt: μM übertragenes Phosphat = $\frac{\text{OD} \times 50 \times 6 \times 0.01}{\text{OD}_s \times 13.2 \times 50}$

Die gemessene OD entspricht der gemessenen Absorption im automatischen Test (s.u.). Der Wert für OD_s entspricht der Absorption der Standard-Phosphatlösung (1 mM Phosphat), der Faktor 50 auf dem Bruchstrich entspricht der Verdünnung im Stop-Puffer, der Faktor 6 der Verdünnung im Ansatz, der Faktor 0.01 entspricht den μM der Phosphorylase a (1 mg/ml), 13.2 entspricht einem Korrekturfaktor des automatischen Tests, der Faktor 50 unter dem

Bruchstrich entspricht der bekannten spezifischen Aktivität der Phosphorylase a.

Zur Einhaltung von jeweils gleichen Bedingungen wird jede Komponente des Handtestansatzes im Testpuffer aufgenommen (1.5 mM GP, 0.75 mM DTE, 100 mM NH_4Cl mit dem erforderlichen pH).

Die Phosphorylase b wird im Testpuffer bei 4° C ca. 8 Stunden dialysiert, die Phosphorylase Kinase darin entsprechend verdünnt (25 x bis 500 x). Der pH wird mit HCl auf 6.8 bzw. 8.6 eingestellt, die Ionenstärke wird mit 100 mM NH_4Cl konstant gehalten, so daß kleine Änderungen gegenüber der Gesamtkonzentration nicht ins Gewicht fallen. Der Handtestpuffer dient zur Zugabe von Ca^{2+} , EGTA, Mg^{2+} und ggfs. zur Einstellung der Ionenstärke.

Vor dem Start werden die Phosphorylase b, das ATP/ Mg^{2+} und der Handtestpuffer zusammenpipettiert und im Reaktionsgefäß 1 bis 3 Minuten vorinkubiert. Im Ansatz sollen von Anfang an 30° C herrschen, und da die Lösungen und Substrate vorher alle auf Eis stehen, sollte auf die Temperatur geachtet werden. Der Start erfolgt mit der Phosphorylase Kinase, da verhindert werden soll, daß während der Vorinkubation eine Selbstphosphorylierung stattfindet. Die Phosphorylase Kinase wird ebenfalls im Testpuffer aufgenommen. Je nach Partialaktivität, die gemessen werden soll, wird sie 25 x, 50 x oder 500 x verdünnt. Diese Verdünnung entspricht etwa $5 \times 10^{-9}\text{M}$, $2.5 \times 10^{-9}\text{M}$ bzw. $2.5 \times 10^{-10}\text{M}$ im Ansatz bei 1 mg/ml Phosphorylase Kinase Ausgangskonzentration.

2.2.2 Messung der Aktivität der Phosphorylase Kinase im Autoanalyzer (43)

Die Aktivitätsmessung erfolgt im Technikon-Auto-Analyzer II. Im ersten Abschnitt werden folgende Lösungen miteinander vermischt: 3 mM ATP, 20 mM Mg-Acetat, 125 mM Tris/HCl, 125 mM GP, 40 mM ME, 0.01 % Triton-X-100, pH 6.8 bzw. 8.6 mit 5 mg/ml AMP-freier Phosphorylase b, 3 % Glycogen, 0.01 % Triton-X-100, 25 mM ME, 10 mM GP, pH 7.0 . Dann wird die Phosphorylase Kinase, verdünnt in 1.5 mM GP, 0.75 mM DTE, 5 mg/ml Rinderserumalbumin, 0.01 % NaN_3 , pH 6.8, dazugepumpt. Nach 5 Minuten wird die Reak-

tion mit 100 mM Na-Maleat, 100 mM NaF, 1 mM EDTA, 10 mM ME, 0.05 % NaN_3 , pH 6.8 durch Verdünnen gestoppt.

Im zweiten Abschnitt wird von dieser Verdünnung ein Aliquot gezogen und die Aktivität der gebildeten Phosphorylase a gemessen (s.o.). Die Aktivität wird in Einheiten pro Milliliter berechnet und ergibt sich aus der folgenden Gleichung:

$$\text{U/ml} = \frac{\text{OD} \times \text{Verdünnung (Probe)}}{\text{OD}_s \times 1.38 \times 1000}$$

Der Wert für OD ist gleich der Extinktion der Probe, OD_s entspricht der Extinktion der Phosphatstandardlösung (100 mM Phosphat). Der Faktor 1.38 ergibt sich aus den Geräteparametern, der Molmasse und der spezifischen Aktivität der Phosphorylase a.

Eine Unit (U) entspricht 1 μMol übertragenem Phosphats pro Minute.

2.2.3 Messung der Aktivität der Phosphorylase b im Autoanalyser

Die Messung erfolgt im Technikon-Autoanalyser II nach der Methode von Haschke und Heilmeyer (44).

2.2.4 Messung der Aktivität der Phosphorylase Phosphatase (45)

Die Phosphorylase Phosphatase wird in 50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, pH 7.5 verdünnt. In den Reaktionsansatz werden 0.1 ml Phosphatase und 0.1 ml Phosphorylase a (^{32}P -markiert) gegeben. Der Start erfolgt mit Phosphorylase a und anschließend werden Proben à 50 μl nach 5, 10, 15 Minuten gezogen und durch Zugabe von 0.1 ml Rinder-serumalbumin und 0.85 ml 10% TCA-Lösung abgestoppt. Die Aliquots bleiben anschließend 10 Minuten auf Eis, werden 10 Minuten lang bei 3 000 x g abzentrifugiert, 0.5 ml vom Überstand abgenommen und in Szintillationsgläschen pipettiert. Zu diesen Proben werden 5 ml Szintillationslösung (s.u.) gegeben und im Liquid-Szintillationszähler von Packard (Modell 2450) die Radioaktivität der Probe gemessen. Um den gesamten Gehalt an Radioaktivität im Ansatz zu bestimmen, wird eine ungefällte Probe mitgezählt. Zur Kontrolle wird ein Ansatz ohne Phosphatase wie oben behandelt und mitgezählt. Eine Unit (U) wird definiert als ein freigesetztes pM Phosphat pro Minute.

2.2.5 Messung der Aktivität der Myosin-Light-Chain-Kinase

Light-Chains mit einem Molekulargewicht von ca. 20 000 werden auf einen Proteingehalt von 5 bis 10 mg/ml gebracht und in einen Ansatz mit folgenden Bestandteilen gegeben : Magnesiumacetat (5 mM), Calmodulin (20 µg/ml), 3 mM Tris/HCl und 0.4 mM DTE, pH 7.5, ATP (1 mM), Light-Chains (ca. 2.5 mg/ml) und die zu testende Probe. Es werden Aliquots à 20 µl nach 0.5, 1, 2, 3 und 4 Minuten und ein Totalwert à 20 µl gezogen. Der ^{32}P Einbau wird wie nachstehend gemessen (46). Eine Unit (U) entspricht 1 pM übertragenem Phosphat pro Minute.

2.2.6 Messung des Einbaus von ^{32}P in Protein (46)

Aus einem Ansatz für Proteinphosphorylierung werden Aliquote entnommen (5 - 50 µl), auf ein Glasfaserplättchen der Firma Whatman (GF/C, 2.5 cm Ø) pipettiert und sofort in eine Lösung aus 10 % TCA, 1 % $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1 % K_2HPO_4 getaucht. Das Protein denaturiert auf dem Plättchen, bleibt daran hängen, das freie Phosphat wird abgespült und das gebundene bleibt in dem präzipitierten Protein enthalten. Die Plättchen werden dann jeweils 15 Minuten in folgenden Lösungen der Reihenfolge nach gewaschen: 10 % TCA, 1 % $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1 % K_2HPO_4 ; 10 % TCA; Wasser; Aceton. Anschließend werden die Plättchen bei ca. 90° C in einem Trockenofen getrocknet.

Die Radioaktivität ist ein Maß für den Einbau von Phosphat in das Protein und wird in einem Liquid-Szintillationszähler von Packard (Modell 2450) gemessen. Zur Messung wird die Probe in ein Szintillationsmeßgefäß überführt und folgende Szintillationslösung hinzugefügt (5 ml) : 3 l Dioxan, 24 g Permablend (Packard) (21.84 g 2,5-Diphenyloxazol und 2.16 g 1,4-Di-(2-Methylstyryl)-Benzol) und 375 g Naphtalin. Um den Gesamtgehalt an Phosphat zu bestimmen, wird eine unbehandelte Probe (Totalwert) mitgezählt, die ebenfalls in der obigen Szintillationslösung aufgenommen wird.

2.2.7 Messung der Proteinkonzentration nach Lowry (47)

Der Test erfolgt bei Raumtemperatur in einem Technikon-Auto-Analyzer II. Die Probe wird vorher zur Abtrennung von störenden Ionen in 10 % TCA auf Eis gefällt, nach 10 Minuten stehen bei 0° C, abzentrifugiert und in 1 % SDS, 0.1 N NaOH gelöst. Der Nachweis des Proteins erfolgt im Autoanalyzer nach der Methode von Lowry et al. (47). Als Standardvergleichslösungen dienen Rinderserumalbumin-Standardlösungen.

2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Weber und Osborn (48)

Für die Gelelektrophorese werden 5 und 10 %-ige SDS-Polyacrylamidgele nach Weber und Osborn in Gelröhrchen (7 x 100 mm) gegossen. Die Gelröhrchen werden in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und die Anoden- und Kathodenkammer mit Kammerpuffer (48) gefüllt. Die Proben (3 bis 10 µg pro Bande) werden im Probenpuffer (28.5 mM NaH_2PO_4 , 72.25 mM Na_2HPO_4 , 1 % SDS, 0.002 % Bromphenolblau, 10 % Glycerin, 150 mM ME, pH 7.2) aufgenommen (etwa gleiches Volumen) und 5 Minuten bei 100° C denaturiert. Die so behandelten Proben werden auf die Geloberfläche in den Gelröhrchen aufgetragen und die Elektrophorese bei einer Stromstärke von 8 mA pro Gel durchgeführt. Nach ca. 3 bis 4 Stunden werden die Gele aus den Glasröhrchen genommen und eine Stunde in eine Färbelösung (0.25 % Coomassie-Brillant-Blau, 9 % Essigsäure, 45 % Methanol) bei Zimmertemperatur gelegt. Nach der Färbung werden dies mit 7.5 % Essigsäure, 5 % Methanol bis auf die Proteinbanden entfärbt. Durch mehrmaliges Wechseln des Entfärbepuffers und durch Erhöhung der Temperatur kann der Entfärbevorgang beschleunigt werden.

2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Cohen (13)

Die Gelelektrophorese nach Cohen baut auf einem ähnlichen Puffersystem wie Weber und Osborn auf. Im übrigen werden die gleichen Methoden wie oben angewandt. Diese Gelelektrophorese hat den Vorteil, daß sie schon nach 1.5 bis 2 Stunden beendet ist.

2.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Portio und Pearson (49)

Diese Gelelektrophorese benutzt ein glycerinhaltiges Puffersystem. Die Probenaufbereitung erfolgt wie oben. Allerdings wird bis zum Einsinken der Proben in das Gel die Elektrophorese mit 0.5 mA Stromstärke pro Gel angefahren. Danach regelt man die Stromstärke auf 1.0 mA pro Gel hoch. Die Elektrophorese ist nach ca. 6 bis 8 Stunden beendet. Die Gele werden dann den Gelröhrchen entnommen und mit 25 % Isopropanol, 10 % TCA 4 Stunden lang fixiert. Färbung und Entfärbung erfolgt anschließend wie oben beschrieben.

2.2.11 Quantitative Auswertung von SDS-Elektrophoresegelelen

Zur Messung der relativen Proteinmengen verschiedener Banden auf angefärbten Polyacrylamid-Gelelen, werden diese mit einem Zeiss-Photometer PMQ II, ausgerüstet mit einem Densitometrier-Zusatzgerät ZK 4, der Länge nach photometriert.

2.2.12 Messung der Calciumkonzentration mit dem Atomabsorptionsspektrometer

Die Calciumkonzentrationen werden mit dem Atomabsorptionsspektrophotometer FMD 3 von Zeiss, mit einer Graphitrohrküvette von Perkin-Elmer HGA 74 durchgeführt. Die Aufzeichnung der Meßsignale erfolgt mit einem hochempfindlichen Schreiber von Radio-

meter REC 61/ REA 112. Zum Einspritzen der Proben wird ein automatischer Probennehmer von Perkin-Elmer AS-1 benutzt, der ein Probevolumen von 10 μ l in die Graphitrohrküvette einspritzt. Die Probe wird dann auf 300° C gebracht, wobei alle flüchtigen Bestandteile verdampfen, danach 20 Sekunden bei 900° C zersetzt und endlich bei 2700° C 15 Sekunden lang atomisiert.

Das Extinktionsmaximum ist bei Calcium nach wenigen Sekunden erreicht und wird vom Schreiber aufgezeichnet. Die Peakhöhe ist ein Maß für den Calciumgehalt der Probe. Als Standardlösungen dienen Calcium-Titrisol-Lösungen, die entsprechend der Eichkurve verdünnt werden. Die Eichkurve ist bis zu etwa 10 μ M Ca linear, die untere Nachweisgrenze liegt bei 5 nM für Calcium. Alle Probengefäße werden, wie schon beschrieben, behandelt, um Verunreinigungen, die zu Fehlmessungen führen würden, auszuschließen. Die Proben werden mit Ca-armem Wasser (Millipore), das ca. 1 μ M Ca-Verunreinigung mitbringt, verdünnt, wobei die Extinktion des Wassers jeweils von der Extinktion der Probe abgezogen wird. Die Genauigkeit der Meßwerte hängt von der Genauigkeit der Verdünnung, der Verunreinigung und dem Einspritzvolumen ab.

2.3 Berechnungen

Alle Rechnungen mit den im folgenden aufgeführten Programmen wurden am Großrechner der Ruhr Universität Bochum ausgeführt. Zum Teil wurden dazu Unterprogramme aus der Programmbibliothek des Rechenzentrums benutzt. Alle Programme sind in der Sprache FORTRAN verfaßt.

2.3.1 Programm COMICS (modifiziert (50))

Dieses Programm dient zur Berechnung der Konzentrationen von freien Metallionen und komplexbildenden Ionen in Lösungen, die diese nebeneinander vorliegen haben. In diesen Fällen ist es besonders wichtig, die freien Ionenkonzentrationen zu wissen. Das Programm berechnet die Konzentrationen der freien Metallionen, Komplexbildner und ihrer verschiedenen Komplexe, einschließlich der protonierten Komplexe, auf der Grundlage des Massenwirkungsgesetzes. Dazu werden die Gesamtkonzentrationen der Metallionen und der Komplexbildner, der pH, die Zahl der gebildeten Komplexe und deren Assoziationskonstanten als Daten benötigt. Die Konstanten können dem Tabellenwerk von Sillen und Martell (51) entnommen werden. Auf Grund der eingegebenen Assoziationskonstanten berechnet das Programm im ersten Rechengang aus den totalen Konzentrationen der Metallionen und der Komplexbildner die Konzentrationen der einzelnen Komplexe. Da aber die Stöchiometrie der einzelnen Komplexe unterschiedlich ist, wird nach einem iterativen Verfahren die Konzentration nach folgender Gleichung errechnet:

$$(1) \quad (M^i)_t = (M^i) + \sum_{j=1}^n c_j P_{i,j}$$

$(M^i)_t$ = totale Konzentration des Metalls i

c_j = die Konzentration der einzelnen im System vorkommenden Komplexe (Gesamtzahl = n)

$P_{i,j}$ = Stöchiometrie der im Komplex j gebundenen Ionen des Metalls i

Nachdem nun für jeden Komplexor und jedes Metallion die rechte Seite der Gleichung berechnet wurde, die mit $(M^i)_t^{\text{calc}}$ bezeichnet

wird, wird die Näherung für (M^i) durch folgenden Ausdruck ersetzt:

$$(M^i) \times ((M^i)_t / (M^i)_t^{\text{calc}})^{1/2}$$

Das Verfahren wird nun iterativ solange wiederholt, bis alle $(M^i)_t^{\text{calc}}$ von den zugehörigen $(M^i)_t$ um weniger als 0.01 % abweichen. Analog wird für die entsprechenden Komplexoren verfahren. Der Rechner druckt schließlich die Konzentrationen der Metallionen, Komplexoren und deren Komplexe in einer Tabelle aus.

Der Text des Programms und die in dieser Arbeit verwandten Assoziationskonstanten sind dem Anhang zu entnehmen.

2.3.2 Programm HYPER (modifiziert (52))

Das Programm dient der Ermittlung der Parameter K_m und $V_{\max}$ nach der Michaelis-Menten-Funktion:

$$(2) \quad v = \frac{V_{\max} \times (X)}{K_m + (X)}$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit

(X) = Konzentration eines Substrates oder Effektors (53)

Die Funktion kann genauso zur Beschreibung eines Substrat- oder Effektorbindungsverhaltens eines Proteins eingesetzt werden. Es müssen einfach v durch die Bindungskapazität r , $V_{\max}$ durch die Sättigungsbindungskapazität n und K_m durch die Dissoziationskonstante K_d ersetzt werden.

Die Basis dieses Programms ist eine nicht lineare Kurvenanpassung auf Grund einer Methode von Wilkinson (54) und Cleland (52), die für diese Kurvenanpassung eine Hyperbel, deren Verlauf enzymatische Kinetiken meistens folgen, zugrunde legten. Mit dieser nichtlinearen Regression vermeidet man die Fehler, die bei einer Linearisierung wie z.B. bei der Lineweaver-Burke-Auftragung (55) durch Verzerrung der Hyperbel auftreten.

Zur Berechnung von $V_{\max}$ und K_m -Werten benötigt man nun die Meßwertpaare (X) und v bzw. r , ihre Gewichtung auf Grund ihrer Meßgenauigkeit und die Anzahl der Datensätze. Es ermittelt über eine lineare Regression nach Lineweaver-Burke die ersten Näherungswerte für K_m und $V_{\max}$ und geht mit diesen in die nichtlineare Regression der Michaelis-Menten-Gleichung ein, die auf einem iterativen Ver-

fahren beruht. Als Ergebnis werden K_m - und V_{max} -Werte, ihre Standardabweichungen und die Streuung der Meßpunkte um die Ausgleichskurve geliefert. Der Text des Programms ist dem Anhang zu entnehmen.

2.3.3 Programm FIT (modifiziert (56))

Dieses Programm führt eine nichtlineare Regression nach einer mehrstufigen Michaelis-Menten-Funktion durch:

$$(3) \quad v = \sum_{i=1}^n \frac{V_{max,i} \times (X)}{K_{m,i} + (X)}$$

Es geht von extern vorgegebenen Schätzwerten für K_m und V_{max} aus und variiert diese systematisch in immer kleineren Schritten. Nach jeder Iteration wird die Summe der Quadrate der Abweichungen zwischen den gemessenen und den berechneten Werten der Kurve berechnet und bei der folgenden Iteration die Schätzwerte dahingehend variiert, daß die Summe der Fehlerquadrate kleiner wird. Nach jeder Variation druckt der Rechner den vollständigen Parametersatz als Zwischenergebnis aus, so daß der Operateur die Entscheidung hat, ob er die Iteration fortführen soll oder ob ihm das Ergebnis gut genug erscheint. Diese Art der Berechnung hat den Vorteil, daß der Operateur die Berechnung direkt in ein Minimum der Fehlerquadratsumme der Meßwerte " steuern " kann und damit vermeidet man, daß die Berechnung in einem Nebenminimum endet. Der Text des Programms ist im Anhang wiedergegeben.

2.3.4 Programm ASSAM (57)

Dieses Programm dient zur Ermittlung der Bindungsparameter von kompetierenden Liganden an ein Protein und hat den Vorteil gegenüber den anderen Programmen, daß es die Kooperativität der Bindung (HILL-Koeffizient) berücksichtigen kann. Es basiert auf einem Gleichungssystem von H.R. Kalbitzer und D. Stehlik und führt damit eine nichtlineare Regression wie das Programm Hyper durch, mit dem Unterschied, daß nicht die Michaelis-Menten-Gleichung,

sondern eine Gleichung in Form der Scatchard-Gleichung als Grundlage dient. Die Iterationen werden wie im Programm FIT durchgeführt und man braucht daher etwas Erfahrung, um das Minimum der Fehlerquadratsumme genau zu treffen. Das Programm braucht folgende Daten:

1. Die Anzahl der Ionensorten
2. Die Anzahl der Datensätze
3. Die Anzahl der zu variierenden Parameter
4. Die Anzahl der Iterationen
5. Die Schwierigkeit der Methode 1, 2 oder 3
6. Den r/C -Wert (oder v/S) für den Übersichtsplot
7. Dämpfungsfaktoren (um die Iterationen nicht zu groß werden zu lassen)
8. Begrenzungsfaktoren für die Methode 2
9. Die Laufzahlen der zu variierenden Parameter
1 - 17 in der Folge N (1 - 4), K (1 - 4), L (1 - 4)
 M (1 - 4) und H .
 N entspricht dem $V_{\max}$, K entspricht dem $1/K_m$
 L entspricht dem $1/K_i$, M entspricht $1/K_{i2}$,
 H entspricht dem Hillkoeffizient
10. Die Schätzwerte der Parameter in der obigen Reihenfolge.
Nicht benutzte Parameter werden gleich 0 gesetzt.
11. Die Gewichtungen der einzelnen Meßwerte
12. Den Datensatz in folgender Form:
 v , Ligand (1) frei, Enzymkonzentration, Ligand (2) frei,
Ligand (3) frei

Als Ergebnis erhält man den Verlauf der Änderungen der Parameter mit den Fehlerquadratsummen, die berechneten Daten, den eingegebenen gegenübergestellt, und die berechneten Parameter mit dem Hillkoeffizienten. Der Text des Programms ist im Anhang wiedergegeben.

2.3.5 Program PFRAME

Mit Hilfe dieses Programms können Daten in ein X, Y-Koordinatensystem eingetragen werden und mit Hilfe eines nicht linear interpolierenden Programmteils durch Linien verbunden werden.

Das Bild wird über einen BENSON-Interpolarplotter mit Beschriftung der X- und Y-Achse und einer Überschrift ausgedruckt, und wenn man mehrere Kurven in ein Bild zeichnen will, auch mit einer Legende für jede Kurve. Auf diese Weise erhält man Zeichnungen, die jeweils gleiche Achsenbeschriftungen und gleiche Maßstäbe haben und die dadurch einen direkten Vergleich erlauben.

Das Programm benutzt dabei die Programme aus der Programmbibliothek des Rechenzentrums der Ruhr Universität Bochum.

Als erstes die Programme PSPLIN und PFRAME und weiter die Prozedur GRAPHIK. Der Text des Programms ist im Anhang wiedergegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche zur Charakterisierung des Verhaltens von Phosphorylase Kinase auf Calmodulin-Sepharose

Eine Affinitätschromatographie auf Calmodulin-Sepharose wurde bei Präparationen der Phosphodiesterase (58) und anderen Enzymen beschrieben (59 , 60 , 61). Nach dem Prinzip, daß alle Enzyme, die als Calciumakzeptor das Calmodulin benutzen, eine Bindungsstelle für Calmodulin besitzen, sollten diese auch über Calmodulin-Sepharose gereinigt werden können. Wang (62) hat gezeigt, daß Phosphorylase Kinase, die zusätzlich zu dem schon integrierten Calmodulin ein weiteres Mol Calmodulin/ α , β , γ , δ (14) binden kann, ebenfalls mit dieser Affinitätschromatographie gereinigt werden kann. Bei der Affinitätschromatographie mit Phosphorylase Kinase aus gemischtem Muskel, die beide Isoenzyme enthält, konnten diese partiell voneinander getrennt werden. Die folgenden Versuche sollten klären, ob sich dieses Verfahren optimieren läßt und ob sich die Isoenzyme der Phosphorylase Kinase so weit unterscheiden, daß sie sich mittels der Affinitätschromatographie auf Calmodulin-Sepharose voneinander trennen lassen.

3.1.1 Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sepharose

Die Calmodulin-Sepharose (Präpariert nach 2.1.9) wird mit Puffer A (50 mM GP, 10 % Saccharose, 2 mM EDTA, 5 mM Mg^{2+} , 10 mM ME, 0.02 % NaN_3 , 0.1 % PMSF, pH 7.0) und 2 mM $CaCl_2$ bei 4° C im Kühlraum äquilibriert. Phosphorylase Kinase aus gemischtem Muskel (Präpariert nach 2.1.1) wird in Puffer A und Zusatz von 2 mM $CaCl_2$ überführt und sofort auf die Calmodulin-Sepharose aufgetragen. Nach dem Auftrag wird die Säule mit Puffer A in Gegenwart von 2 mM $CaCl_2$ nachgewaschen bis im Eluat keine Absorption bei 280 nm mehr nachzuweisen ist. Dieser Teil wird Durchlauf (Pool 1) genannt. Dann wird mit Puffer A versetzt mit der niedrigeren Konzentration von 0.2 mM $CaCl_2$ ein Teil der absorbierten Phosphorylase Kinase eluiert, der als Pool 2 gesammelt wird.

Sobald wieder im Eluat keine Absorption bei 280 nm mehr zu erkennen ist - nach ca. 3 bis 5 Säulenvolumen - wird mit Puffer A, dem 2 mM EGTA zugesetzt wurde, die restliche Phosphorylase Kinase von der Säule gewaschen und im Pool 3 gesammelt. Während des gesamten Säulenlaufs wird fraktioniert und anschließend jede Fraktion auf Protein nach 2.2.7 und auf Phosphorylase Kinase Aktivität nach 2.2.2 bei pH 6.8 und 8.6, entsprechend der A_1 - bzw. A_2 -Aktivität (16) untersucht. Von den Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt werden Proben mittels SDS-Gelelektrophorese nach Portio und Pearson (49) untersucht. Das Ergebnis wird in den Bildern 1 und 2a, b, c, wiedergegeben. Das Bild 1 zeigt, daß bei jeder Elutionsstufe der Proteingehalt in den Fraktionen parallel mit der Aktivität der Phosphorylase Kinase bei pH 6.8 (A_1 -Aktivität) und pH 8.6 (A_2 -Aktivität) steigt und fällt.

Nach SDS-Gelelektrophorese sind im Allgemeinen im Pool 1 keine nennenswerten Mengen an Phosphorylase Kinase mehr vorhanden (siehe Bild 2a). In diesem Versuch wurde ein Überschuß an Phosphorylase Kinase auf die Calmodulin-Sepharose aufgetragen. Dieser wird nicht gebunden und findet sich im Durchlauf wieder. Die Phosphorylase Kinase erscheint im Pool 2 und im Pool 3 von höhermolekularen Verbindungen gereinigt. Das Verhältnis der α - zur α' -Bande beträgt im Pool 2 ca. 1 : 1 . Im Pool 3 ist die α' -Bande nur noch schwach zu erkennen und das Verhältnis beträgt ca. 10 : 1 .

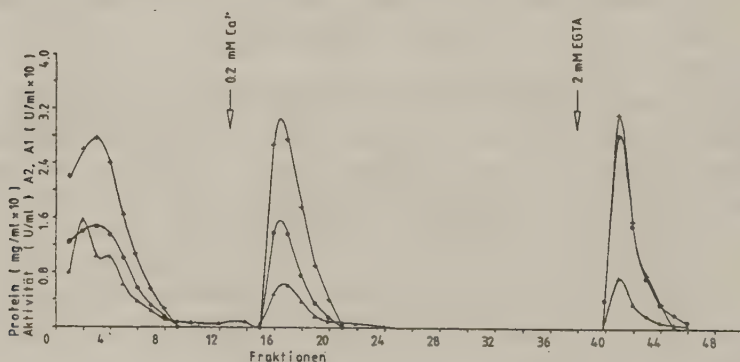
Die Bilanz zeigt, daß nur insgesamt etwa 14 % des adsorbierten Proteins von der Calmodulin-Sepharose eluiert werden kann. Die Aktivitätsbilanz zeigt dagegen, daß ca. 100 % von der gebundenen A_2 -Aktivität wiedergewonnen werden kann.

Tabelle 1: Bilanz des Calmodulin-Sepharose-Säulenlaufes

	: mg	: %	: U (A_2):	: %	: U (A_1):	: %	: A_1/A_2
	gebunden		gebunden		gebunden		
Pool 1	: 1.15	: 0.0	: 15.12	: 0.0	: 2.71	: 0.0	: 0.18
Pool 2	: 0.34	: 7.3	: 8.00	: 39.0	: 0.96	: 79.0	: 0.12
Pool 3	: 0.30	: 6.5	: 12.05	: 59.0	: 0.75	: 62.0	: 0.06
Gesamt	: 1.79	: -	: 35.17	: -	: 4.42	: -	: -
Aufgetragen:	5.78	: -	35.60	: -	3.92	: -	: 0.11
Am Gel sind irreversibel gebunden :							
	: 3.99	: 86.2	: 0.43	: 2.1	: 0.00	: 0.0	: -
insgesamt	: 4.63	: 100.0	: 20.48	: 100.0	: 1.21	: 100.0	: -

Es sind insgesamt 10.02 U(A_2) an einen Milliliter gepackte Calmodulin-Sepharose gebunden worden. Die Phosphorylase Kinase wurde im Pool 3 mit einer spezifischen Aktivität von 40.17 U/mg eluiert.

Bild 1 Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sepharose



Die Durchführung des Versuchs ist in 3.1.1 beschrieben. Die Fraktionen 1 bis 10 entsprechen dem Pool 1, bzw. dem Durchlauf, die Fraktionen 15 bis 21 entsprechen dem Pool 2 und die Fraktionen 40 bis 45 dem Pool 3. Das Zeichen o gibt den Verlauf der A_2 -Aktivität an, + den Verlauf der A_1 -Aktivität und Δ den Verlauf der Proteinkonzentration.

SDS-Gelelektrophorese (Pool 1)

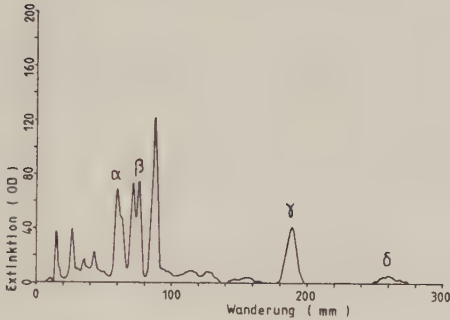


Bild 2 SDS-Gelelektrophorese von Pool 1, Pool 2 und Pool 3 von der Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sephrose

Die SDS-Polyacrylamidgele (nach 2.2.10) wurden nach 2.2.11 ausgewertet und mittels des Programms PFRAME gezeichnet.

Bild 2a zeigt das SDS-Gel des Pools 1

SDS-Gelelektrophorese (Pool 2)

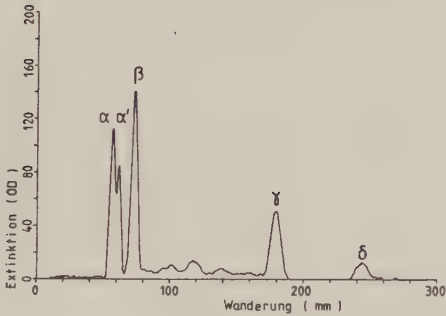


Bild 2b zeigt das SDS-Gel des Pools 2

SDS-Gelelektrophorese (Pool 3)

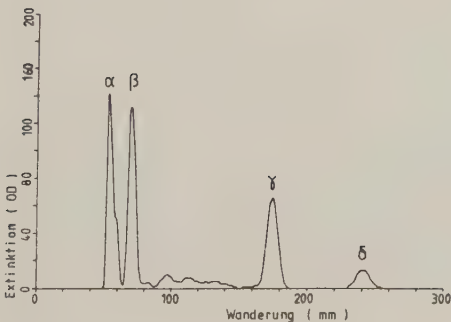


Bild 2c zeigt das SDS-Gel des Pools 3

3.1.2 Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sephrose mit einem Calcium-Gradienten

Mit der umseitig beschriebenen Methode einer stufenweisen Elution war das rote Isoenzym der Phosphorylase Kinase vom weißen Isoenzym aus gemischtem Muskel nicht zu trennen. Es wird nun versucht, diese Trennung mit einem Calcium-Gradienten zu erreichen. Dazu wird eine Calmodulin-Sephrose-Säule (0.6×10 cm) wie in 3.1.1 äquilibriert und mit Phosphorylase Kinase beladen. Dann wird ein negativer Gradient von 0.5 mM bis $25 \mu\text{M}$ Ca^{2+} angelegt. Das Eluat wird fraktioniert und jede Fraktion auf Protein nach 2.2.7 und Phosphorylase Kinase-Aktivität nach 2.2.1 untersucht. Zusätzlich wird der Ca^{2+} -Gehalt mit Hilfe der AAS nach 2.2.12 kontrolliert (Bild 3).

Das Bild zeigt deutlich, daß bis ca. $400 \mu\text{M}$ Ca^{2+} der Pool 1 erscheint, an der hohen A_1 -Aktivität zu erkennen, anschließend sieht man Pool 2 bei $200 \mu\text{M}$ Ca^{2+} . Bei ca. $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} erscheint schließlich der Rest der eluierbaren Phosphorylase Kinase. Es läßt sich beobachten, daß die spezifische Aktivität (A_2) mit fortlaufender Elution wie im vorherigen Experiment ansteigt. Das Verhältnis der A_1 - zur A_2 -Aktivität wird bei Pool 1, 2 und 3 jeweils kleiner, wie im vorangehenden Versuch. Pool 3 wird aber schon bei ca. $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} und nicht erst bei Absenken der Calciumkonzentration durch Zusatz von EGTA eluiert. Nach SDS-Gelelektrophorese kann, wie oben, gezeigt werden, daß das weiße Isoenzym der Phosphorylase Kinase zwischen 50 und $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} im Pool eluiert werden kann (siehe Bild 2 c).

Um das Elutionsverhalten der Phosphorylase Kinase bei höheren Calciumkonzentrationen aufzuklären, wird die Calciumkonzentration in Stufen von 3 mM Ca^{2+} über 1.0 mM, 0.5 mM, 0.3 mM, 0.2 mM und schließlich durch Zusatz von 2 mM EGTA auf ca. 10 nM herabgesetzt. Es ist bemerkenswert, daß schon bei 1 mM Ca^{2+} Phosphorylase Kinase eluiert wird. Ebenso wird bei 0.5 mM, 0.3 mM und 0.2 mM Ca^{2+} Protein und Aktivität der Phosphorylase Kinase eluiert (siehe Bild 4). Nach SDS-Gelelektrophorese zeigt sich, daß der prozentuale Anteil der α' -Bande gegenüber der α -Bande sinkt (siehe Bild 5, Tabelle 2).

Tabelle 2: Auswertung von SDS-Polyacrylamidgelen (nach 2.2.11)
Prozentualer Flächenanteil der α - und α' -Unterein-
heit in Bezug auf die Gesamtfläche des photometrier-
ten Enzyms

Elution bei	3.0 mM	1.0 mM	0.5 mM	0.3 mM	0.2 mM	EGTA	:
α -Bande	17.1 %	21.9 %	26.2 %	36.4 %	20.8 %	29.0 %	:
α' -Bande	16.9 %	14.5 %	14.5 %	10.5 %	4.7 %	6.7 %	:
α'/α	0.99	0.66	0.55	0.46	0.23	0.23	:

Das rote Isoenzym der Phosphorylase Kinase wird mittels eines kontinuierlichen oder auch eines Stufengradienten nur partiell vom weißen Isoenzym getrennt.

3.1.3 Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sephrose - Elutionsverhalten in Abhängigkeit von der Salz- konzentration -

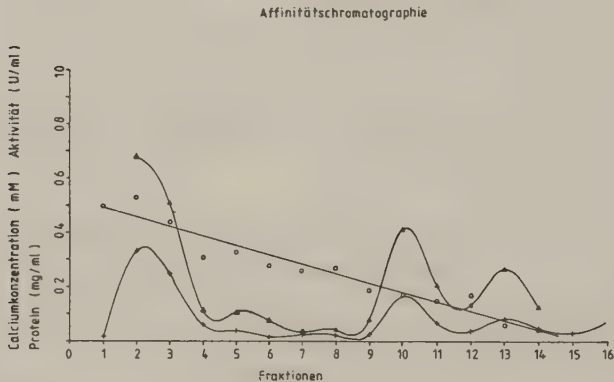
Da bei der Affinitätschromatographie ebenso wie bei der Ionenaustauschchromatographie und bei den Proteinen allgemein die Salzkonzentration bzw. die Ionenstärke eine Rolle spielt, wird hier ebenso untersucht, welchen Einfluß die Erhöhung der Salzkonzentration auf das Elutionsverhalten der Phosphorylase Kinase von der Calmodulin-Sephrose hat.

Dazu wird eine kleine Säule (2 ml Inhalt) mit Calmodulin-Sephrose nach 3.1.1 äquilibriert und mit Phosphorylase Kinase beladen. Nach dem Waschen mit Puffer A in Gegenwart von 2 mM Ca^{2+} , wird derselbe Puffer mit 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM und 500 mM KCl versetzt und nacheinander zum Eluieren der Phosphorylase Kinase benutzt. Anschließend wird diese Prozedur mit Puffer A unter Zusatz von 0.2 mM Ca^{2+} und daraufhin mit Puffer A in Gegenwart von 2 mM EGTA wiederholt. Die Elutionen werden mit Hilfe eines UV-Monitores bei 280 nm verfolgt und fraktioniert. Fraktionen, bei denen durch erhöhte Absorption Protein angezeigt wird, werden gesammelt und auf Proteingehalt nach 2.2.7 und auf Phosphorylase Kinase mittels SDS-Gelelektrophorese nach 2.2.10 untersucht. Die Phosphorylase Kinase wird unter drei Bedingungen

eluiert: 1. im Durchlauf, 2. bei 0.2 mM Ca^{2+} und 3. bei 0.2 mM Ca^{2+} in Gegenwart von 100 mM KCl. Bemerkenswert ist, daß die Fraktion, die hier bereits bei 0.2 mM Ca^{2+} und 100 mM KCl eluiert wird, sonst erst mit Puffer A und 2 mM EGTA eluiert werden kann, bei welchem nun keine Phosphorylase Kinase eluiert wird. Dagegen reicht in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} eine Erhöhung der Ionenstärke auf 500 mM KCl nicht aus, die Phosphorylase Kinase zu eluieren.

Bild 3

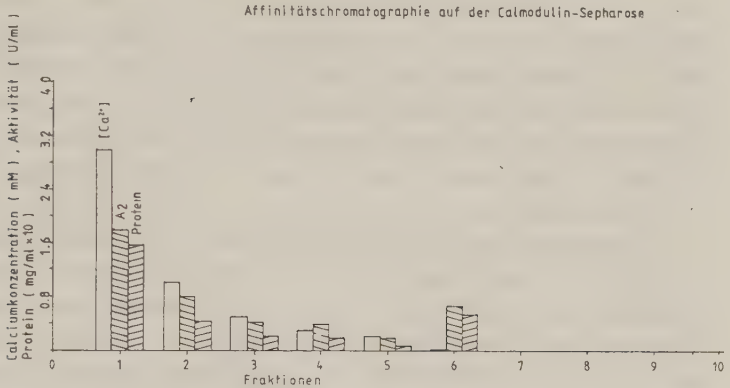
Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sephrose mit einem absteigenden Calciumgradienten



Die Durchführung des Versuches ist in 3.1.2 beschrieben. Das Zeichen o gibt den Verlauf der Calciumkonzentration an, Δ die Aktivität A_2 und + die Proteinkonzentration

Bild 4

Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sepharose mit einem absteigenden Stufengradienten

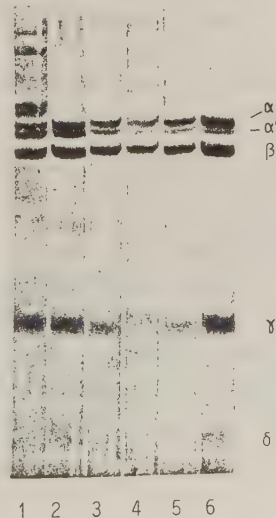


Die Affinitätschromatographie wird wie in 3.1.2 beschrieben durchgeführt. Die weißen Balken geben die Calciumkonzentration wieder, die von links oben nach rechts unten schraffierten Balken geben die Aktivität A₂ wieder, die von rechts oben nach links unten schraffierten Balken (jeweils rechts) geben die Proteinkonzentration wieder.

Bild 5

SDS-Gelelektrophorese von den Fraktionen 1 bis 6 der Affinitätschromatographie mit absteigendem Stufengradienten

Die SDS-Gelelektrophorese wird nach 2.2.10 durchgeführt, der Versuch ist in 3.1.2 und in Bild 4 dargestellt. Die SDS-Gelelektrophorese zeigt die Anreicherung des roten Isoenzyms in den Fraktionen 1, 2 und 3 gegenüber den Fraktionen 5 und 6. Weiterhin kann man deutlich erkennen, daß die höhermolekularen Verunreinigungen, die in Fraktion 1 vorhanden sind, ab Fraktion 2 nicht mehr festgestellt werden können.



3.1.4 Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sephrose mit autophosphorylierter Phosphorylase Kinase

Die vorherigen Versuche haben gezeigt, daß die Isoenzyme der Phosphorylase Kinase nur partiell durch Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sephrose trennbar sind. Offenbar wird das Elutionsverhalten der Phosphorylase Kinase nicht nur von den Eigenschaften der Isoenzyme bestimmt, sondern auch von anderen Faktoren, möglicherweise von z.B. partieller Proteolyse oder Phosphorylierung.

Die Phosphorylase Kinase wird daher vor dem Auftrag auf die Calmodulin-Sephrose nach 2.1.12 phosphoryliert. Der Verlauf der Phosphorylierung wird im Bild 6 dokumentiert. Nach 15 Minuten wird der Phosphorylierungsansatz mit dem doppelten Volumen an eiskaltem Auftragspuffer A in Gegenwart von 2 mM Ca^{2+} verdünnt und im Eisbad gelagert. Von dort wird der so gestoppte Ansatz sofort auf die Calmodulin-Sephrose aufgetragen. Alle weiteren Schritte werden wie in 3.1.1 durchgeführt.

Die Bilanz des Calmodulin-Sephrose-Säulenlaufes ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3: Bilanz des Calmodulin-Sephrose-Säulenlaufes mit autophosphorylierter Phosphorylase Kinase

	: mg	: % gebunden	: U (A_1):	% gebunden	: U (A_2):	% gebunden	: A_1/A_2
Pool 1	: 1.53	: 0.0	: 3.440	: 0.0	: 10.790	: 0.0	: 0.32
Pool 2	: 0.07	: 25.0	: 0.031	: 10.2	: 0.141	: 0.7	: 0.22
Pool 3	: 0.05	: 17.9	: 0.003	: 1.0	: 0.023	: 0.01	: 0.13
Gesamt	: 1.65	: -	: 3.474	: -	: 10.995	: -	: -
Aufge- tragen	: 1.81	: -	: 3.744	: -	: 31.524	: -	: 0.12
Am Gel sind irreversibel gebunden :							
	: 0.16	: 57.1	: 0.270	: 88.8	: 20.569	: 99.2	: -
insgesamt:	: 0.28	: 100.0	: 0.304	: 100.0	: 20.734	: 100.0	: -

Es werden 165 U (A_2 -Aktivität) pro Milliliter gepackte Calmodulin-Sepharose gebunden. Die Phosphorylase Kinase wird mit einer spezifischen Aktivität von 0.47 U/mg im Pool 3 eluiert. Im Gegensatz zu den vorher durchgeführten Säulenläufen auf der Calmodulin-Sepharose werden hier weniger als 1 % der gebundenen A_2 -Aktivität in den Pools 2 und 3 nachgewiesen. Der größte Teil bleibt irreversibel an der Calmodulin-Sepharose gebunden, obwohl etwa 40 % des adsorbierten Proteins abgelöst werden kann. Unter der Voraussetzung, daß der Phosphorylierungsgrad bei allen Phosphorylase Kinase-Molekülen gleich ist, wird das Protein über den Phosphateinbau in die Phosphorylase Kinase berechnet. Das an der Calmodulin-Sepharose irreversibel gebundene Protein ist auf Grund der festgestellten Radioaktivität ebenfalls phosphoryliert. Daraus kann geschlossen werden, daß die Phosphorylase Kinase, die überwiegend A_2 -Aktivität ausdrückt, an der Calmodulin-Sepharose irreversibel gebunden bleibt.

Der Quotient aus der A_1 - und der A_2 -Aktivität zeigt an, daß die Phosphorylase Kinase im Pool 1 proteolytisch angedaut ist. Pool 2 und Pool 3 haben jeweils einen niedrigeren Quotienten aus A_1 und A_2 .

Eine Trennung des roten vom weissen Isoenzym wird nicht beobachtet.

Der zuletzt beschriebene Versuch wird abgewandelt wiederholt. Es sollte festgestellt werden in wie weit exogenes Calmodulin die Autophosphorylierung und die anschließende Adsorption an der Calmodulin-Sepharose beeinflusst.

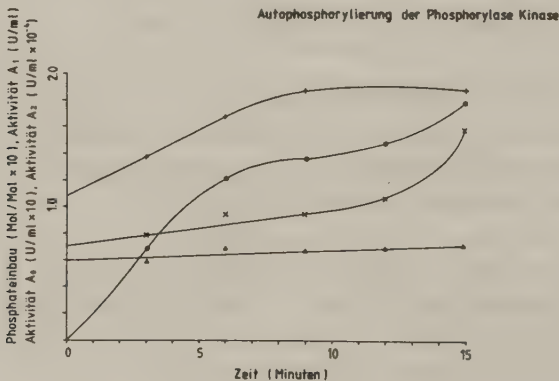
Exogenes Calmodulin wird im Verhältnis 5 : 1 zur Phosphorylase Kinase dem Autophosphorylierungsansatz (2.1.12) zugegeben. Der anschließende Säulenlauf auf der Calmodulin-Sepharose wird wie oben durchgeführt.

Die Ergebnisse der Autophosphorylierung sind dem Bild 7 zu entnehmen, die Bilanz des Calmodulin-Sepharose-Säulenlaufes ist in Tabelle 4 durchgeführt. Die Menge des irreversibel gebundenen Proteins wird wieder auf Grund des in die Phosphorylase Kinase eingebauten Phosphats bestimmt. Die Tabelle 4 zeigt, daß der Einfluß des exogen zugegebenen Calmodulins auf die Affinitätschromatographie klein ist, während der Phosphateinbau durch dieses stark gehemmt wird.

Tabelle 4: Bilanz des Calmodulin-Sepharose-Säulenlaufes mit autophosphorylierter Phosphorylase Kinase in Gegenwart von exogenem Calmodulin

	: mg	: % gebunden	: U (A ₁): gebunden	: % gebunden	: U (A ₂): gebunden	: % gebunden	: A ₁ /A ₂
Pool 1	: 1.37	: 0.0	: 1.060	: 0.0	: 4.060	: 0.0	: 0.26
Pool 2	: 0.06	: 19.4	: 0.006	: 1.0	: 0.044	: 1.2	: 0.13
Pool 3	: 0.04	: 12.9	: 0.002	: 0.4	: 0.008	: 0.2	: 0.21
Gesamt	: 1.47	: -	: 1.068	: -	: 4.118	: -	: -
Aufge- tragen	: 1.68	: -	: 1.624	: -	: 7.798	: -	: 0.21
Am Gel sind irreversibel gebunden :							
	: 0.20	: 65.8	: 0.556	: 98.6	: 3.686	: 98.6	: -
insgesamt:	0.31	100.0	0.564	100.0	3.738	100.0	-

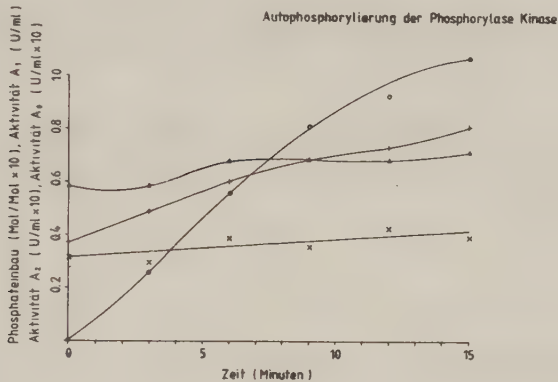
Bild 6 Autophosphorylierung der Phosphorylase Kinase



Die Versuchsdurchführung erfolgt wie in 3.1.4 beschrieben. Das Zeichen o gibt den Verlauf des Phosphateinbaus in die Phosphorylase Kinase (Mol P_i eingebaut / Mol Phosphorylase Kinase), das Zeichen Δ den Verlauf der Aktivität A₀, das Zeichen + den Verlauf der Aktivität A₁ und das Zeichen x den Verlauf der Aktivität A₂ an.

Bild 7

Autophosphorylierung der Phosphorylase Kinase in
Anwesenheit von exogenem Calmodulin



Die Durchführung des Versuchs erfolgt wie in 3.1.4 beschrieben. Das Zeichen $\circ$ gibt den Verlauf des Phosphateinbaus in die Phosphorylase Kinase (Mol P_i eingebaut / Mol Phosphorylase Kinase), das Zeichen Δ den Verlauf der Aktivität A_0 , das Zeichen $+$ den Verlauf der Aktivität A_1 und das Zeichen $\times$ den Verlauf der Aktivität A_2 wieder.

3.1.5 Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sepharose
- Test auf Phosphorylase Phosphatase und Myosin-Light-
Chain-Kinase -

Die Effektivität einer Reinigungsprozedur zeigt sich durch die Abtrennung von kontaminierenden Enzymen, die, schon in Spuren vorhanden, die Messung der Aktivität der Phosphorylase Kinase beeinflussen können. Stellvertretend werden hier die Phosphorylase Phosphatase und die Myosin-Light-Chain-Kinase während eines Calmodulin-Sepharose-Säulenlaufes getestet.

Der Säulenlauf erfolgt wie in 3.1.1 beschrieben. Im Pool 1, 2 und 3 werden Aktivität der Phosphorylase Kinase (nach 2.2.2), Protein (nach 2.2.7), Phosphorylase Phosphatase (nach 2.2.4) und Myosin-Light-Chain-Kinase (nach 2.2.5) untersucht.

Es ergibt sich die folgende Tabelle 5 :

Tabelle 5: Test auf Phosphorylase Phosphatase und Myosin-Light-Chain-Kinase im Verlauf der Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sepharose

	: Auftrag	: Pool 1	: Pool 2	: Pool 3	:
Protein	: 2.2	: 0.08	: 0.06	: 0.04	: mg / ml
Phosphorylase Kinase (A_2)	: 16.496	: 1.092	: 0.271	: 0.159	: U / ml
Myosin-Light- Chain-Kinase	: 365.0	: 154.0	: 20.0	: 18.0	: U / ml
Phosphorylase Phosphatase	: 14.4	: 2.9	: -.-	: -.-	: U / ml

Während sich die Myosin-Light-Chain-Kinase Aktivität kaum abtrennen läßt, wie der Quotient aus Myosin-Light-Chain-Kinase und Phosphorylase zeigt :

M.L.C.Kin. : 0.022 : 0.141 : 0.074 : 0.113 :
Phos.Kin.

ist die Phosphorylase Phosphatase in den Pools 2 und 3 nicht mehr nachweisbar :

Phos.Phos. : 8.7×10^{-4} : 2.7×10^{-3} : -.- : -.- :
Phos.Kin.

Die Myosin-Light-Chain-Kinase erweist sich - wie erwartet - als Calmodulin-bindendes Protein, das auf diese Weise nicht abgetrennt werden kann, während die Phosphorylase Phosphatase offenbar nicht an die Calmodulin-Sepharose bindet und deshalb im Pool 2 und 3 nicht mehr vorhanden ist.

3.2 Reinigung des Isoenzyms der Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel

Aus den vorausgegangenen Versuchen hat sich ergeben, daß das rote Isoenzym der Phosphorylase Kinase aus gemischtem Kaninchen-skelettmuskel mittels Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sepharose nur angereichert werden kann. Da im roten Kaninchen-skelettmuskel die Phosphorylase Kinase überwiegend aus diesem Isoenzym besteht (3), soll es nun aus diesem Muskeltyp präpariert werden.

3.2.1 Präparation

Die Skelettmuskulatur des Kaninchens besteht nur aus ca. 2 % roter Muskulatur, so daß bei jeder Präparation, die von Kaninchen-skelettmuskeln ausgeht, roter Muskel extra präpariert werden mußte.

Dazu wird der rote Muskel von den Unterschenkeln und Oberschenkeln der Vorder- und Hinterläufe, dem Gesäß und dem Rücken der Kaninchen excidiert, auf Eis gelegt, gesammelt und bei -20°C eingefroren. Aus einer Präparation von acht Kaninchen kann auf diese Weise ca. 150 g roter Muskel gewonnen werden. Sobald 1 000 g roter Muskel gesammelt sind, wird er in einem Lyophilisator gefriergetrocknet, und kann dann unbegrenzt bei -20°C gelagert werden. Alle weiteren Schritte werden bei 4°C oder auf Eis ausgeführt.

EXTRAKTION : 200 g roter lyophilisierter Muskel wird mit dem Homogenisator (Waring-Blendor) eine Minute lang auf Stufe 1 trocken zerkleinert und dann mit dem 12.5-fachen seines Gewichtes an Puffer (10 mM Tris/HCl, 4 mM EDTA, pH 9.3) versetzt und 45 Sekunden bei höchster Stufe homogenisiert. Der viskose Brei sollte einen pH von 6.8 haben (kontrollieren), und wird bei $13\,000 \times g$ abzentrifugiert (25 Minuten lang). Der Überstand wird über Glaswolle abfiltriert, sein Volumen gemessen und dann 1:1 mit Puffer B (20 mM GP, 4 mM EDTA, 40 mM ME, 100 μM PMSF, 0.02 % NaN_3 , 40 % Sucrose, pH 7.0) versetzt.

HYDROPHOBE CHROMATOGRAPHIE : Der Rohextrakt wird mit 1/10 des Volumens an Methylsepharose 4 B versetzt und 1.5 Stunden lang

gerührt. Der Absorptionsvorgang der Phosphorylase Kinase wird im Bild 8 wiedergegeben. Anschließend wird der Ansatz über einen Büchnertrichter gegeben und so abgesaugt, daß das Gel nicht trocken läuft. Das Gel wird dann mit dem 1:1 verdünnten Puffer B so lange gewaschen, bis die rote Farbe des Myoglobins verschwunden ist, und dann in eine Säule mit 5 cm Ø und 30 cm Höhe eingeschlemmt. Die Säule wird mit 1:1 verdünntem Puffer B (300 ml/h) gespült, bis am Monitor bei 280 nm keine Absorption mehr registriert wird. Die Elution erfolgt mit dem 1:1 verdünnten Puffer B unter Zusatz von 140 mM NaCl über einen Fraktionskollektor. Die Fraktionen werden auf Aktivität geprüft und die Aktivität enthaltenden Fraktionen gesammelt und eine 7 bis 10-fache Anreicherung der Phosphorylase Kinase erreicht.

AMMONIUMSULFATFÄLLUNG : Die gesammelten Fraktionen werden mit dem 0.6-fachen Volumen an 3.5 M Ammoniumsulfatlösung (pH 7.0) versetzt. Die Fällung wird 15 Minuten lang auf Eis stehen gelassen und dann bei 15 000 x g 20 Minuten lang abzentrifugiert. Das Sediment wird in wenig Puffer C (50 mM GP, 20 mM ME, 2 mM EDTA, pH 7.0) gelöst.

GELFILTRATION : Das gelöste Sediment wird auf eine Sepharose 4 B-Säule mit 3 Litern Inhalt aufgetragen, die mit Puffer C äquilibriert ist. Bei der Elution beobachtet man 2 Proteingipfel - an Hand der Absorption bei 280 nm gemessen - ; proteinhaltige Fraktionen werden auf Phosphorylase Kinase-Aktivität untersucht und die Aktivität enthaltenden Fraktionen vereinigt. (Bild 9).

IONENAUSTAUSCH-CHROMATOGRAPHIE : Die vereinigten Fraktionen werden auf eine DEAE-Cellulose-Säule von ca. 360 ml Inhalt aufgetragen, die mit Puffer D (50 mM GP, 2 mM EDTA, 1 mM DTE, 0.02 % NaN_3 , pH 7.0) äquilibriert ist. Nach dem Waschen mit Puffer D, wird ein linear ansteigender Gradient von 0 bis 500 mM NaCl angelegt. Das Eluat wird fraktioniert und die Fraktionen werden auf Phosphorylase Kinase-Aktivität untersucht. Die Fraktionen, die Aktivität enthalten, werden entsprechend der Angabe in Bild 10 vereinigt.

KONZENTRATION : Die vereinigten Fraktionen werden in eine Amicon-Zelle gegeben und bei 1.8 atm N_2 -Druck über einer XM 100 Membrane 10-fach konzentriert oder mindestens bis zu einer Proteinkonzentration von 1.0 mg/ml. Das Konzentrat wird bei $-20^\circ C$ eingefroren und gelagert. (Tabelle 7).

AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE : Im Kapitel 3.1 konnte gezeigt werden, daß eine Reinigung der Phosphorylase Kinase mittels Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sepharose erreicht werden kann. Trotz teilweiser irreversibler Bindung der Phosphorylase Kinase an der Calmodulin-Sepharose wird diese Affinitätschromatographie als letzter Reinigungsschritt benutzt, da klassische Reinigungsverfahren keine weitere Anreicherung mehr erbracht haben (siehe Dickneite, 31).

Bei einer weniger gut gereinigten Phosphorylase Kinase kann eine Salzstufe die fester anhaftenden nicht erwünschten Proteine loslösen, ohne die Bindung der Phosphorylase Kinase an der Calmodulin-Sepharose zu beeinträchtigen. Die Calciumstufe bei 0.2 mM Ca^{2+} wird weggelassen, da wir von einem einheitlichen Isoenzym ausgehen. Die Affinitätschromatographie wird wie in 3.1.1 ausgeführt. Dazu wird eine Säule (0.6 x 20 cm) mit Calmodulin-Sepharose gefüllt, mit Puffer A in Gegenwart von 2 mM Ca^{2+} äquilibriert. Das rote Isoenzym wird in denselben Puffer überführt und aufgetragen. Nach dem Waschen mit dem Auftragspuffer unter Zugabe von 500 mM NaCl, wird die Säule mit Puffer A und 2 mM EGTA eluiert. (Bild 11). Die Bilanz dieses Säulenlaufes wird in der folgenden Tabelle 6 aufgeführt:

Tabelle 6: Bilanz des Calmodulin-Sepharose-Säulenlaufes mit dem Isoenzym der Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel

	: mg	: % gebunden	: U (A_1)	: % gebunden	: U (A_2)	: % gebunden	: A_1/A_2 :
Durchlauf	: 6.63	: 0.0	: 0.241	: 0.0	: 2.509	: 0.0	: 0.10
Waschen	: 0.82	: 13.1	: 0.066	: 4.5	: 1.147	: 4.5	: 0.06
Elution	: 1.08	: 17.3	: 0.511	: 35.0	: 17.631	: 69.1	: 0.03
Gesamt Aufge- tragen	: 8.52	: -	: 0.818	: -	: 21.287	: -	: -
	: 12.87	: -	: 1.701	: -	: 28.008	: -	: 0.06
Am Gel sind	irreversibel gebunden:						
	: 4.35	: 69.7	: 0.883	: 60.5	: 6.721	: 26.4	: -
insgesamt	: 6.24	: 100.0	: 1.460	: 100.0	: 25.499	: 100.0	: -

Die Bilanz ergibt folgendes Bild: Es werden ca. 17 % des adsorbierten Proteins mit EGTA eluiert und etwa 70 % der gebundenen A_2 -Aktivität. Die Phosphorylase Kinase wird mit dieser Methode etwa siebenfach angereichert.

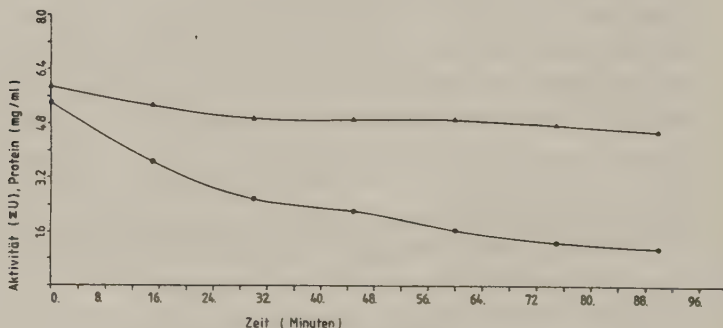
Von der Gesamtmenge des adsorbierten Proteins bleiben ca. 70 % irreversibel an der Calmodulin-Sepharose gebunden. Die Kapazität der Calmodulin-Sepharose beträgt 0.953 U/(ml gepackte Calmodulin-Sepharose), das ist etwa ein Zehntel der Kapazität, die bei dem weißen Isoenzym beobachtet wird: 10.000 U/(ml gepackte Calmodulin-Sepharose).

Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt werden zusammengegeben und bei 4° C in 75 % Glyzerin, 1.5 mM GP, 0.75 mM DTE, pH 7.5 fünf Stunden lang dialysiert und damit ca. fünfmal konzentriert. In dieser Form kann das Isoenzym der Phosphorylase Kinase bei -20° C aufbewahrt werden.

Bild 8

Adsorption des Isoenzyms der Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel an der Methylamin-substituierten Sepharose 4 B

Adsorption an die Methylaminsepharose 4 B



Die Proben wurden mit Hilfe einer Spritze durch ein feinmaschiges Metallsieb nach je 15 Minuten aus dem Ansatz gezogen und nach 2.2.2 auf A_2 -Aktivität und nach 2.2.7 auf Protein untersucht. Das Zeichen ○ gibt den Verlauf der Aktivität A_2 und das Zeichen Δ den Verlauf der Proteinkonzentration in der Lösung wieder.

Das Ergebnis der Reinigung ist in Tabelle 7 zusammengefaßt. Die Phosphorylase Kinase wurde 380-fach angereichert und hat eine spezifische Aktivität von 12.7 U/mg.

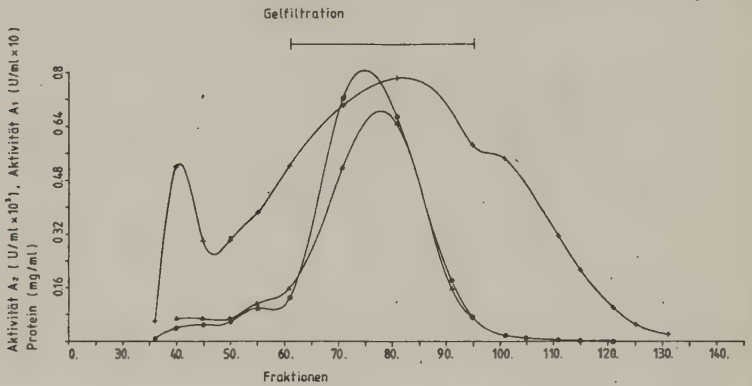
Tabelle 7: Reinigungstabelle der Präparation des Isoenzym
der Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel

	Abkür- zung	Volu- men ml	Aktivität (A ₂)		Spez. AK- tivität U/mg (A ₂)	Anrei- cher- ung	Aus- beute %	Protein		Aus- beute %
			U/ml	Σ U				mg/ml	Σ mg	
Rohextrakt	RE	3300	0.231	764.075	0.033	0.0	100.0	6.96	22959	100.00
Methyl- Sepharose	DL	4790	0.036	173.458	0.009	-.-	-.-	4.28	20517	89.00
	EL	1070	0.446	477.938	0.232	7.0	62.6	1.92	2054	8.50
Ammoniumsulfat- fällung	AS	41	4.513	185.032	0.232	7.0	24.2	19.40	798	3.50
Gelfiltration	P 4B	588	0.298	175.497	0.590	17.7	23.0	0.50	297	1.92
Ionen austausch- chromatographie	P DEAE	315	0.364	114.865	1.649	49.5	15.0	0.22	70	0.30
Konzentration	Amicon	43	2.280	98.074	1.838	55.2	12.8	1.24	53	0.23
Affinitäts- chromatographie	Cm-4B	53	14.736	78.102	12.703	381.0	10.2	1.16	6	0.03

Diese Daten beziehen sich auf eine Präparation aus 200g rotem lyophilisiertem Muskel. Die einzel-
nen Schritte wurden, wie in 3.2.1 beschrieben, durchgeführt, die Aktivität A₂ wurde nach 2.2.2 und
die Proteinkonzentration nach 2.2.7 bestimmt.

Bild 9

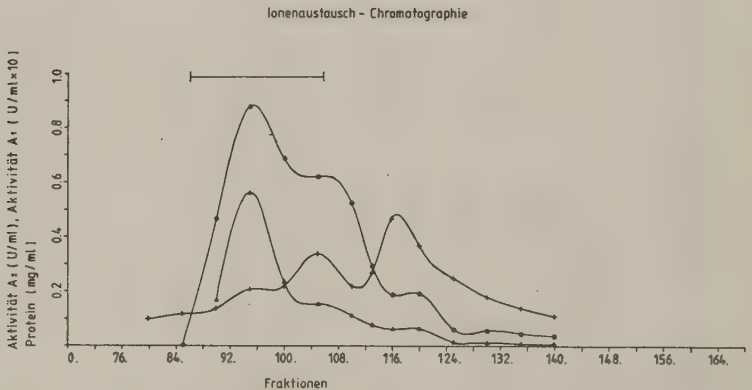
Gelfiltration des Isoenzyms der Phosphorylase Kinase
nach der Ammoniumsulfatfällung über Sepharose 4 B



Die Nachweise von den Aktivitäten A₁ und A₂ wurden nach 2.2.2, der Nachweis auf Protein nach 2.2.7 durchgeführt. o = Aktivität A₂, Δ = Aktivität A₁, + = Protein. Der Balken bestimmt das Intervall, dessen Fraktionen vereinnigt werden.

Bild 10

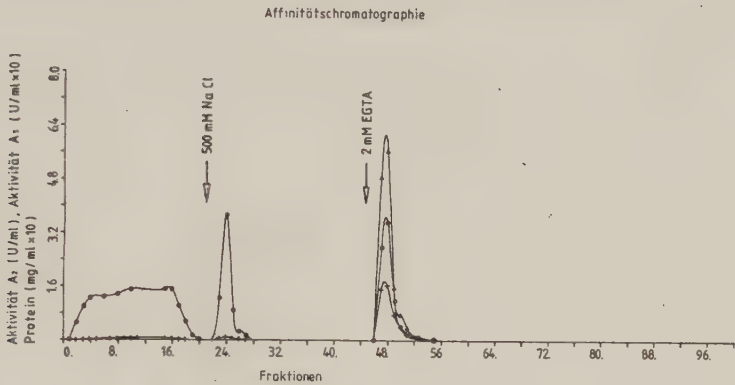
Ionenaustauschchromatographie mit dem roten Isoenzym



Nach der Gelfiltration werden die vereinnigten Fraktionen auf eine DEAE-Celulose-Säule aufgepumpt und mit einem ansteigenden NaCl-Gradienten eluiert (siehe 3.2.1). Das Bild zeigt das Elutionsdiagramm, in dem die Aktivitäten A₂ (o) und A₁ (Δ) (nach 2.2.2 bestimmt) und Protein (+) (nach 2.2.7 bestimmt) aufgetragen sind.

Bild 11

Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sepharose



Das vorgereinigte Isoenzym der Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel wird, wie in 3.2.1 beschrieben auf eine Calmodulin-Sepharose-Säule gegeben und eluiert. Die Fraktionen 1 bis 20 entsprechen dem Durchlauf, die Fraktionen 22 bis 27 dem Waschen mit Puffer A in Gegenwart von 2 mM Ca^{2+} und 500 mM NaCl und die Fraktionen 46 bis 52 entsprechen der Elution mit Puffer A in Anwesenheit von 2 mM EGTA. Die Aktivitäten A_1 (+) und A_2 (Δ) werden nach 2.2.2 bestimmt, die Proteinkonzentration (o) wird nach 2.2.7 bestimmt.

3.2.2 Charakterisierung des gereinigten Isoenzyms der Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel durch Elektrophorese in Gegenwart von SDS

Die Reinheit der Phosphorylase Kinase kann anhand der Elektrophorese in Gegenwart von SDS überprüft werden. Die spezifische Aktivität von 12.703 U/mg zeigt an, daß das Isoenzym aus rotem Muskel rein ist. Die SDS-Gelelektrophorese wird nach 2.2.10 durchgeführt.

Das Bild 12 zeigt die Photographie eines SDS-Rundgels des roten Isoenzyms (rechts) im Vergleich mit dem SDS-Rundgel des aus gemischtem Muskel gewonnenen Enzyms. Das Bild 13a zeigt die Auswertung eines SDS-Gels vom gereinigten roten Isoenzym im Vergleich mit dem " Rohprodukt " vor dem Auftrag auf die Calmodulin-Sepharose (Bild 13b). Das Isoenzym aus rotem Muskel enthält die Untereinheiten α' , β , γ und δ . Die quantitative

Auswertung nach 2.2.11 ergibt vernachlässigbare Andeutungen von Verunreinigungen (Bild 13a).

Bild 12

Vergleich des Isoenzyms aus rotem Muskel (rechts) mit dem aus gemischtem Muskel (links) durch Elektrophorese in Gegenwart von SDS nach 2.2.10

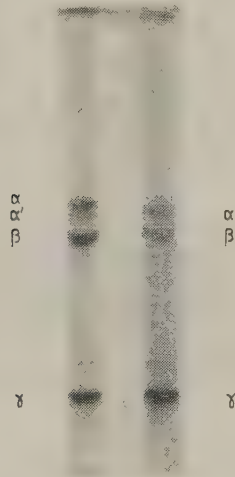


Bild 13

Vergleich der Reinheit des Isoenzyms aus rotem Muskel vor (Bild 13b) und nach (Bild 13a) der Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sepharose

SDS-Gelelektrophorese

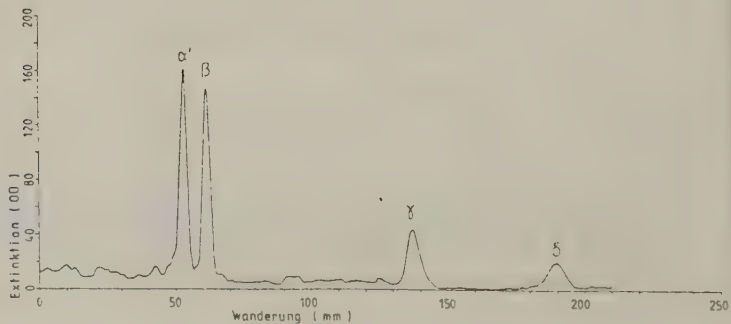


Bild 13a zeigt die Auswertung eines SDS-Rundgeles (nach 2.2.11) des Isoenzyms der Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel, nachdem es durch Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sephrose gereinigt worden ist.

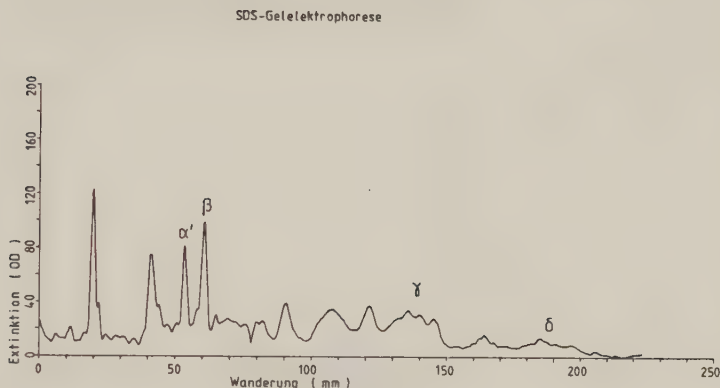


Bild 13b zeigt die Auswertung eines SDS-Rundgeles (nach 2.2.11) des roten Isoenzyms vor dem Auftrag auf die Calmodulin-Sephrose. Die Phosphorylase Kinase ist hier noch stark mit anderen Proteinen verunreinigt.

3.2.3 Charakterisierung des gereinigten Isoenzyms aus rotem Muskel: Zeit-Umsatz-Abhängigkeit in Bezug auf das Substrat Phosphorylase b

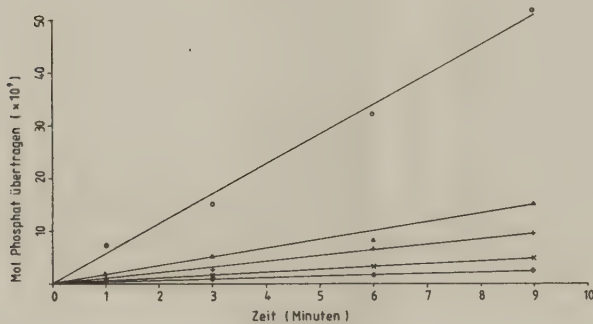
Das partiell gereinigte Isoenzym der Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel ergibt keine lineare Zeit-Umsatz-Kurve, sondern eine parabelförmig ansteigende Kurve. Die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit bereitete daher einige Schwierigkeiten (31).

Das über Calmodulin-Sephrose gereinigte Enzym zeigt dieses Verhalten nicht (siehe Bild 14 und 15). Die Abhängigkeit des

Umsatzes der Phosphorylase b von der Konzentration des Enzyms ist ebenfalls linear (Bild 15a). Damit sind die Voraussetzungen für eine einfache Auswertung der folgenden kinetischen Messungen gegeben.

Bild 14

Zeit-Umsatz-Abhängigkeit bei pH 6.8 in Bezug auf unterschiedliche Konzentrationen des Isoenzym der Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel bei gleichbleibender Phosphorylase b-Konzentration



Das Isoenzym wird in unterschiedlichen Konzentrationen bei dem Aktivitätstest nach 2.2.1 eingesetzt. Es werden folgende Konzentrationen gewählt: 12 µg/ml (o), 6 µg/ml (Δ), 2.4 µg/ml (+), 1.2 µg/ml (x) und 0.6 µg/ml (◇). Die Abweichungen der Meßwerte von der Geraden liegen noch innerhalb der tolerierbaren Fehlergrenzen (10 %).

Bild 15

Zeit-Umsatz-Abhängigkeit bei pH 8.6 in Bezug auf unterschiedliche Konzentrationen des roten Isoenzym

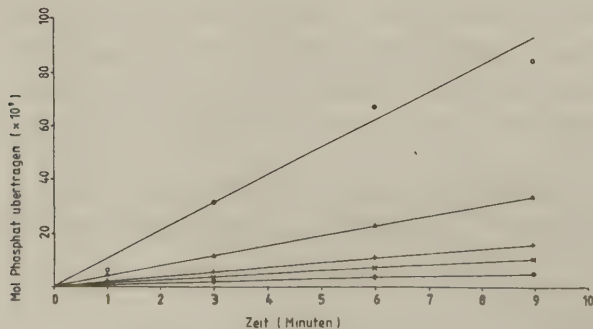
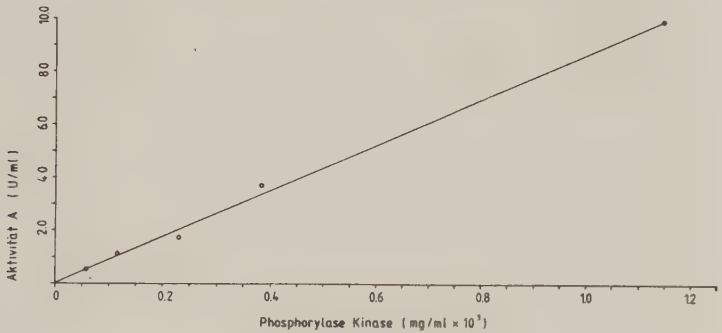


Bild 15 zeigt den Einbau von Phosphat in die Phosphorylase b in Abhängigkeit von der Zeit bei pH 8.6 und bei unterschiedlichen Phosphorylase Kinase-Konzentrationen: 1.2 $\mu\text{g/ml}$ (o), 0.4 $\mu\text{g/ml}$ (Δ), 0.24 $\mu\text{g/ml}$ (+), 0.12 $\mu\text{g/ml}$ (x) und 0.06 $\mu\text{g/ml}$ ($\diamond$). Die Phosphorylase b-Konzentration bleibt jeweils gleich. Die Testbedingungen wurden nach 2.2.1 gewählt.

Bild 15a

Abhängigkeit der Aktivität bei pH 8.6 von der Konzentration des roten Isoenzym



Der Auftrag der Aktivität A_2 gegen die Konzentration des roten Isoenzym zeigt die lineare Abhängigkeit der beiden Parameter. Die Werte wurden dem Bild 15 entnommen.

3.3 Vergleich der Isoenzyme der Phosphorylase Kinase - kinetische Messungen -

Die Unterschiede der beiden Isoenzyme zeigen sich bisher nur in der Affinität zum Calmodulin, das an die Calmodulin-Sephrose 4 B gebunden ist. Im Vergleich weist die Calmodulin-Sephrose für das weiße Isoenzym eine ca. 10-fach höhere Kapazität als für das rote Isoenzym auf.

Die Aufgaben der Phosphorylase Kinase innerhalb der Glycogenolyse sind im roten wie im weißen Muskel gleich. Die Unterschiede sollten den unterschiedlichen Anforderungen der beiden Muskeltypen angepaßt sein. Sie sind deshalb im Bereich der Regulation durch Calcium und Magnesium und der Substrataffinitäten zu suchen. Das Isoenzym aus rotem Muskel wird nach 3.2.1 präpariert.

Um bei dem Vergleich der beiden Isoenzyme gleichmässig behandelte Chargen zu erhalten, wird das Isoenzym aus gemischtem Muskel (nach 2.1.1 präpariert) ebenfalls mittels Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sephrose (nach 3.1.1) gereinigt. Die Messungen der Aktivität der Phosphorylase Kinase werden nach 2.2.1 bei kontrolliertem Ca^{2+} -Konzentrationen nach 2.1.11 vorgenommen.

3.3.1 Abhängigkeit der Isoenzyme von der Ca^{2+} -Konzentration

Die Calcium-Abhängigkeit der Aktivität der Phosphorylase Kinase wurde schon von Kilimann (16) an dem weißen Isoenzym untersucht. Er stellte fest, daß drei Partialaktivitäten existieren: Die calcium-unabhängige Aktivität A_0 , die calcium-hochaffine Aktivität A_1 und die calcium-niedrigaffine Aktivität A_2 . Zur Differenzierung der Isoenzyme ist es notwendig, diese Partialaktivitäten und deren Verhalten bei beiden Isoenzymen zu untersuchen und im Vergleich zu sehen, wo Unterschiede festzustellen sind. Zwar haben beide Isoenzyme das Calmodulin als Calcium-bindende Untereinheit (14), aber die Übertragung des Signals vom Calmodulin auf die Phosphorylase Kinase und dessen

Auswirkung auf die Aktivität können unterschiedlich sein. Die Testreihe wird bei kontrollierten Ca^{2+} -Konzentrationen (nach 2.1.11) und im Handtest (nach 2.2.1) durchgeführt. Die Calciumverunreinigung beträgt für die Phosphorylase b $42 \mu\text{M}$, das ATP/Mg^{2+} $18.6 \mu\text{M}$, den Kinase-Verdünnungspuffer $6.85 \mu\text{M}$, die Kinase selbst wird durch Elution mittels 2 mM EGTA gewonnen. Berücksichtigt man noch die Verdünnung im Ansatz, so beträgt die Calcium-Kontamination etwa $22.5 \mu\text{M}$. Die EGTA-Verunreinigung ist von der Verdünnung der Phosphorylase Kinase abhängig und beträgt bei 25-facher Verdünnung $7 \mu\text{M}$ im Ansatz. Bei höheren Verdünnungen der Phosphorylase Kinase ist diese ganz zu vernachlässigen. Die obige Calcium-Kontamination wird bei der Berechnung der halb-maximalen Aktivierung berücksichtigt. Die Auswertung wird mit dem Programm ASSAM durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Stufen, die zu den einzelnen Partialaktivitäten führen, bei beiden Isoenzymen parallel liegen (siehe Bild 16 und 17).

Die K'_m -Werte der beiden Isoenzyme liegen in der gleichen Größenordnung, aber die V_{max} -Werte des roten Isoenzym für A_0 und A_1 sind nicht gleich denen des weißen Isoenzym, während die V_{max} -Werte für A_2 nur um 10 % differieren (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8 : Vergleich der Aktivität der Isoenzyme in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration und dem pH anhand der kinetischen Parameter

	: weisses : Isoenzym : pH 8.6	: rotes : Isoenzym : pH 8.6	: weisses : Isoenzym : pH 6.8	: rotes : Isoenzym : pH 6.8	:
$V_{\text{max}} A_0$	: 0.10	: 0.08	: 0.056	: 0.016	: U/mg
$K'_m (\text{Ca}^{2+}) A_1$	: 1.59×10^{-7}	: 1.32×10^{-7}	: 9.8×10^{-6}	: 1.06×10^{-5}	: M
$V_{\text{max}} A_1$	: 0.59	: 0.37	: 0.14	: 0.18	: U/mg
$K'_m (\text{Ca}^{2+}) A_2$	: 8.93×10^{-7}	: 1.02×10^{-6}	: --	: --	: M
$V_{\text{max}} A_2$	: 1.31	: 1.20	: --	: --	: U/mg
Hillkoeff.	: $2.4^{*)}$	: $2.4^{*)}$	: $0.9^{\oplus)}$	: $0.8^{\oplus)}$	:

$^{*)}$ bezogen auf die A_2 -Aktivität $^{\oplus)}$ bezogen auf die A_1 -Aktivität

Bei beiden Isoenzymen zeigen die Testreihen bei pH 8.6 deutlich die drei Aktivitätsstufen A_0 , A_1 und A_2 in unterschiedlichen Höhen. Erwartungsgemäß beobachtet man keinen Anstieg zu der Grundaktivität A_0 . Die $V_{\max}$ -Werte der A_0 - und A_2 -Aktivität des roten Isoenzymen liegen nur ca. 10 %, die $V_{\max}$ -Werte der A_1 -Aktivität ca. 40 % unter denen des weißen Isoenzymen. Für die A_2 -Aktivität wird rechnerisch ein Hillkoeffizient von ca. 2.4 für beide Isoenzyme ermittelt. Das bedeutet, daß bei diesen Isoenzymen eine Kooperativität zwischen zwei oder mehr Substratbindungsstellen besteht.

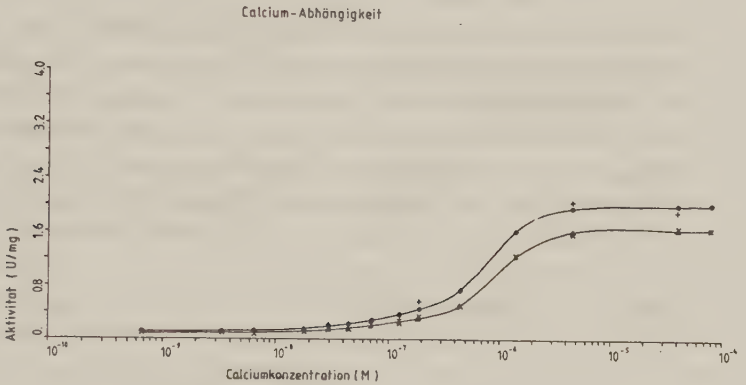
Die Berechnungen der Parameter aus den Testreihen bei pH 6.8 ergeben einen Hillkoeffizienten nahe bei 1.0.

Hier liegt ein Hinweis auf die Natur der Partialaktivitäten, der weiter verfolgt werden soll.

Die Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel zeigt bei pH 6.8 eine niedrigere Grundaktivität A_0 als beim weißen Isoenzym. Das Verhältnis von A_0 zu A_1 liegt bei 0.086 und beim weißen Isoenzym bei 0.407 also einen Faktor 5 höher. Hier liegt wohl ein signifikanter Unterschied zum weißen Isoenzym vor.

Bild 16

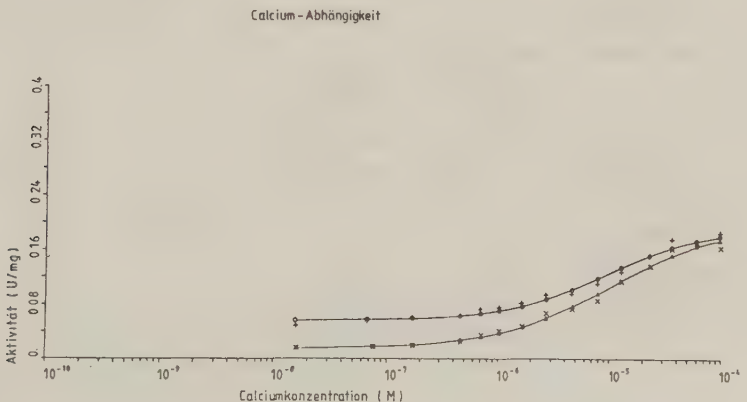
Abhängigkeit der Isoenzyme von der Calciumkonzentration bei pH 8.6



Die Calciumkonzentration im Testansatz wurde mit dem Handtestpuffer (1.5 mM GP, 0.75 mM DTE, 100 mM NH_4Cl , 84 mM MgCl_2 , 6 mM EGTA, pH 8.6) nach Berechnungen mit dem Programm COMICS (2.3.1) eingestellt. Das Zeichen + entspricht den Meßwerten des weißen Isoenzym, das Zeichen x denen des roten. Die Kurven mit den theoretisch berechneten Werten (o , $\blacktriangle$) wurden mit den Programmen FIT, HYPER und ASSAM ermittelt und mit dem Programm PFRAME gezeichnet.

Bild 17

Abhängigkeit der Isoenzyme der Phosphorylase Kinase von der Calciumkonzentration bei pH 6.8



Die Testreihen wurden im Handtest nach 2.2.1 durchgeführt, die Calciumkonzentration im Test wurde mit dem Handtestpuffer (s.o.) eingestellt. Das Zeichen + entspricht der Aktivität des weißen Isoenzym, das Zeichen x der Aktivität des roten Isoenzym. Die Zeichen o und $\blacktriangle$ entsprechen den berechneten Werten (s.o.).

3.3.2 Vergleich der Aktivität der Isoenzyme bei steigendem Magnesiumionengehalt mit Ausgleich der Ionenstärke

Die Magnesiumkonzentration muß in Abhängigkeit von der EGTA- und Calciumkonzentration berechnet und danach die Ionenstärke auf einen konstanten Wert eingestellt werden, indem entsprechend Ammoniumchlorid zugegeben wird. Diese Berechnungen werden nach 2.3.1 mit dem Programm COMICS angestellt. Der Versuch selbst wird nach 2.2.1 im Handtest ausgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgt nach 2.3.4 mit dem Programm Assam.

Tabelle 9: Abhängigkeit der Aktivität der Isoenzyme von der Magnesiumkonzentration

	: weisses : Isoenzym : A ₀	: rotes : Isoenzym : A ₀	: weisses : Isoenzym : A ₁	: rotes : Isoenzym : A ₁	:
K _m (Mg ²⁺)	: 1.6x10 ⁻⁴	: 3.8x10 ⁻⁴	: 7.1x10 ⁻⁴	: 1.2x10 ⁻³	M
V _{max}	: 0.04	: 0.01	: 0.19	: 0.25	U/mg
Hillkoeff.	: 1.0	: 1.0	: 2.3	: 1.4	:
V ₀	: 0.01	: 0.01	: -.-	: -.-	U/mg
K _i (Mg ²⁺)	: 1.8x10 ⁻³	: 7.9x10 ⁻³	: 2.2x10 ⁻²	: 8.3x10 ⁻²	M

	: weisses : Isoenzym : A ₂	: rotes : Isoenzym : A ₂	:
K _m (Mg ²⁺)	: 5.3x10 ⁻⁴	: 5.9x10 ⁻⁴	M
V _{max}	: 1.74	: 1.13	U/mg
Hillkoeff.	: 0.9	: 1.2	:
K _i (Mg ²⁺)	: 6.2x10 ⁻²	: 2.1x10 ⁻²	M

Es läßt sich feststellen, daß alle drei Partialaktivitäten der Isoenzyme der Phosphorylase Kinase durch Mg^{2+} aktiviert werden und bei hohen Konzentrationen auch inhibiert werden (siehe Tabelle 11 und Bild 18 und 19).

Bei der A_0 -Aktivität lassen sich zwei Aktivitätsstufen feststellen: Zum einen eine Grundaktivität, die bei beiden Isoenzymen gleich ist, zum anderen eine Aktivitätsstufe, die beim weißen Isoenzym ca. viermal so hoch ist wie beim roten Isoenzym. Die Grundaktivität wird durch V_0 beschrieben. Die A_1 - und A_2 -Aktivitäten können mit einer Stufe gut berechnet werden.

Das rote Isoenzym hat bei den Aktivitäten A_0 und A_1 deutlich höhere K'_m -Werte. Bei der A_2 -Aktivität liegt der K'_m -Wert im gleichen Bereich wie der des weißen Isoenzym.

Die V_{max} -Werte des roten Isoenzym sind bei der A_0 - und A_2 -Aktivität niedriger, bei der A_1 -Aktivität dagegen höher als die des weißen Isoenzym.

Die K'_i -Werte der A_1 - und A_2 -Aktivität liegen eine Größenordnung höher als die der A_0 -Aktivität. Das rote Isoenzym wird bei der A_0 - und der A_1 -Aktivität erst durch höhere Magnesiumkonzentrationen bei der A_2 -Aktivität durch niedrigere Magnesiumkonzentrationen gehemmt. Für die A_1 -Aktivität ergibt sich bei beiden Isoenzymen ein deutlich über 1.0 liegender Hillkoeffizient, der Kooperativität anzeigt.

Bild 18

Abhängigkeit der Aktivität des roten Isoenzym von der Magnesiumkonzentration mit Ausgleich der Ionenstärke

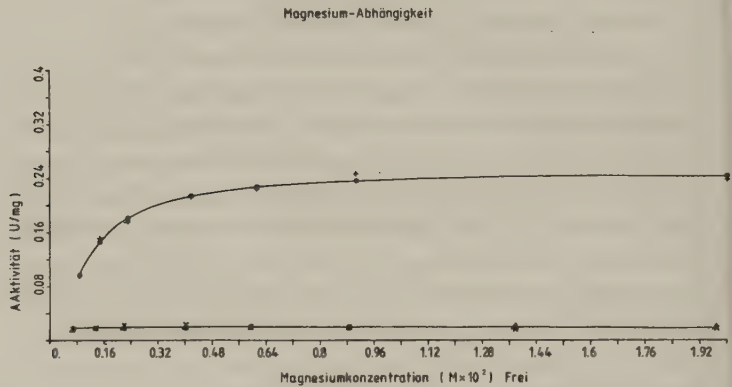


Bild 18a

Abhängigkeit der Aktivität A_0 (x) und A_1 (+) von der Magnesiumkonzentration. Die Symbole o und $\blacktriangle$ entsprechen den berechneten Werten.

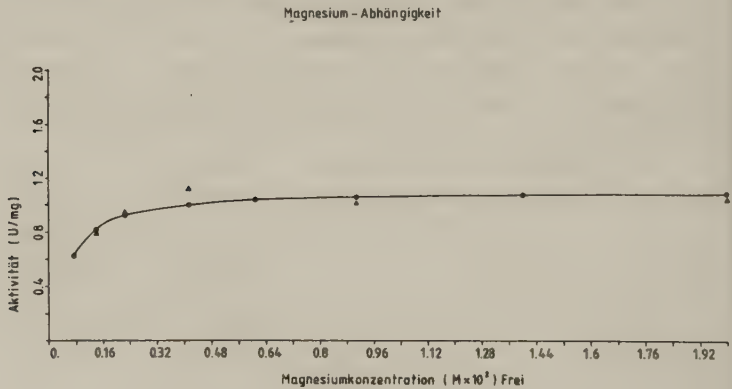


Bild 18b

Abhängigkeit der Aktivität A_2 von der Magnesiumkonzentration

Die Magnesiumkonzentration wurde mit dem Handtestpuffer (1.5 mM GP, 0.75 mM DTE, 100 - x mM NH_4Cl (x = 4 x $C_{Mg^{2+}}$), 6 mM EGTA, pH 6.8 für A_0 , plus 6.6 mM Ca^{2+} für A_1 und pH 8.6 für A_2) eingestellt. Die Ausgleichsgeraden wurden mit dem Programm ASSAM berechnet und über das Programm PFRAME gezeichnet. Die berechneten Werte sind mit dem Symbol o gekennzeichnet, $\blacktriangle$ steht für die experimentell gefundenen Werte.

Bild 19

Abhängigkeit der Aktivität des weißen Isoenzym von der Magnesiumkonzentration mit Ausgleich der Ionenstärke

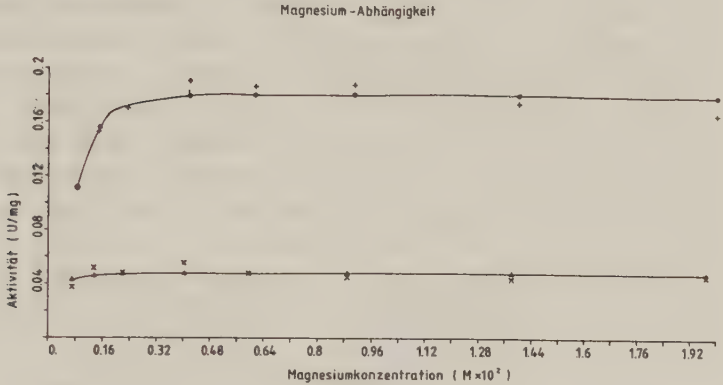


Bild 19a

Abhängigkeit der Aktivität A_0 (x) und A_1 (+) von der Magnesiumkonzentration. Die Zeichen o und $\blacktriangle$ stehen für die theoretisch ermittelten Werte.

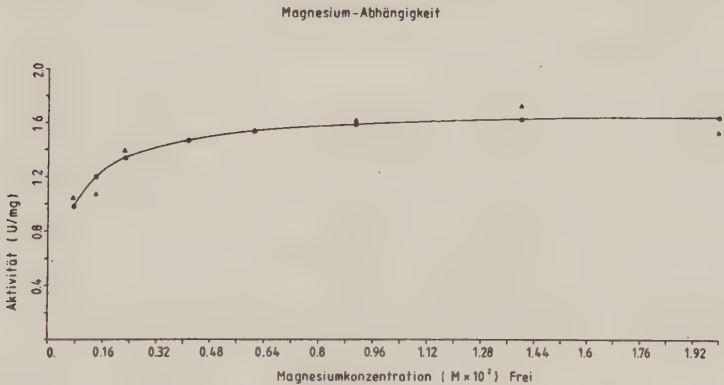


Bild 19b

Abhängigkeit der Aktivität A_2 von der Magnesiumkonzentration

Die Versuche wurden unter gleichen Bedingungen und parallel zu den obigen Versuchen mit dem roten Isoenzym durchgeführt. Die Magnesiumkonzentration wurde mit dem Handtestpuffer (siehe Bild 18) eingestellt. Die Ausgleichsgeraden wurden mit dem Program ASSAM berechnet und über das Program PFRAME gezeichnet. Das Zeichen o gibt die berechneten und $\blacktriangle$ die experimentell ermittelten Werte an.

3.3.3 Vergleich der Aktivität der Isoenzyme bei steigender Magnesiumkonzentration ohne Ausgleich der Ionenstärke

Die Testreihe wird unter den gleichen Bedingungen wie oben durchgeführt, mit dem Unterschied, daß hier die Ammoniumionen-konzentration bei 100 mM bleibt und nur die Magnesiumionen-konzentration geändert wird. Es wird bis 200 mM Mg^{2+} gemessen, welches einer Ionenstärke von 900 mM NH_4Cl entspricht.

Die Auswertung der Daten wird mit dem Programm ASSAM (2.3.4) durchgeführt. Es ergeben sich folgende kinetische Parameter:

Tabelle 10: Abhängigkeit der Aktivität der beiden Isoenzyme von der Magnesiumkonzentration ohne Ausgleich der Ionenstärke

	: weisses : Isoenzym : A_0	: rotes : Isoenzym : A_0	: weisses : Isoenzym : A_1	: rotes : Isoenzym : A_1	:
K_m'	: 5.68×10^{-4}	: 5.38×10^{-1}	: 3.36×10^{-2}	: 4.93×10^{-2}	: M
V_{max}	: 0.05	: 0.26	: 0.49	: 1.65	: U/mg
Hillkoeff.	: 1.4	: 2.3	: 1.4	: 1.1	:
K_i'	: 1.7×10^{-2}	: -.-	: 2.5×10^{-1}	: 4.6×10^{-1}	: M
V_0	: -.-	: 0.02	: -.-	: -.-	: U/mg

	: weisses : Isoenzym : A_2	: rotes : Isoenzym : A_2	:
K_m'	: 1.54×10^{-3}	: 7.81×10^{-4}	: M
V_{max}	: 1.15	: 3.14	: U/mg
Hillkoeff.	: 1.0	: 0.4	:
K_i'	: 1.03×10^{-1}	: 2.07×10^{-1}	: M

Die A_0 -Aktivität der Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel kann wieder mit zwei Aktivitätsstufen berechnet werden.

Die erste Aktivitätsstufe ergibt etwa die gleichen Parameter, wie im vorherigen Experiment (3.3.2) gemessen. Die zweite Aktivitätsstufe ist bei 200 mM Mg^{2+} noch nicht an ihrem Maximum angelangt. Die anderen Partialaktivitäten können durch eine Stufe gut beschrieben werden. (Bild 20, 21)

Die A_1 -Aktivität weist gegenüber dem vorherigen Experiment (3.3.2) eine Besonderheit auf:

Die Aktivität steigt bis ca. 90 mM Mg^{2+} an, bevor die Inhibition durch Mg^{2+} wirksam wird. Für das Enzym aus gemischtem Muskel ist eine ähnliche Aktivierung bekannt (28). Das rote Isoenzym zeigt eine dreimal so hohe A_1 -Aktivität, wie das weiße Isoenzym.

Die K'_m -Werte liegen bei 49.3 bzw. 33.6 mM Mg^{2+} . Bei dieser Konzentration wird allerdings partiell die A_2 -Aktivität auch bei pH 6.8 ausgebildet (16).

Die A_2 -Aktivität beider Isoenzyme besitzt ein Maximum bei etwa 10 mM Mg^{2+} mit einem K'_m -Wert um 1 mM Mg^{2+} . Danach fällt die Aktivität rapide bis auf die Höhe der Aktivität A_1 ab (Bild 20 b, 21 b)

Bild 20

Abhängigkeit des roten Isoenzyms von der Magnesiumkonzentration ohne Ausgleich der Ionenstärke

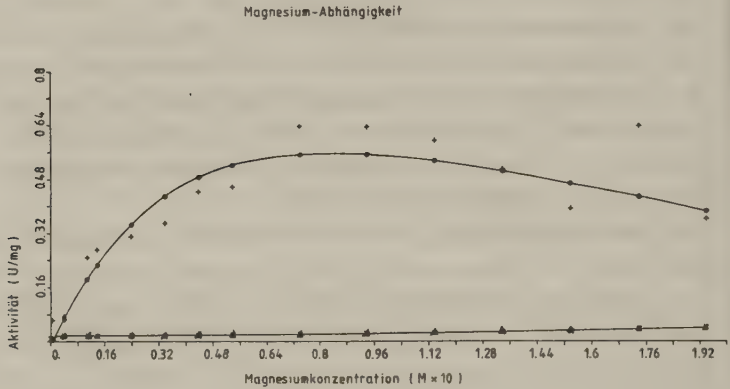


Bild 20a

Abhängigkeit der Aktivität A_0 (x) und A_1 (+) von der Magnesiumkonzentration ohne Ausgleich der Ionenstärke. Die berechneten Werte sind mit o bzw. $\blacktriangle$ gekennzeichnet.

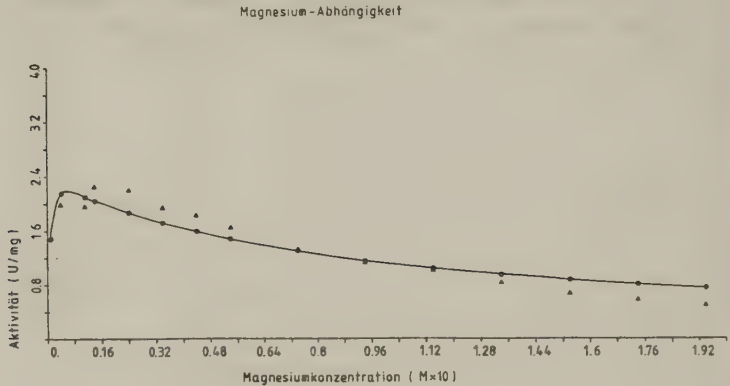


Bild 20b

Abhängigkeit der Aktivität A_2 von der Magnesiumkonzentration ohne Ausgleich der Ionenstärke

Die Magnesiumkonzentration wurde nach 2.2.1 über den Handtestpuffer (1.5 mM GP, 0.75 mM DTE, 100 mM NH_4Cl , 6 mM EGTA für A_0 , zusätzlich 6.6 mM Ca^{2+} für A_1 und pH 8.6 für A_2) eingestellt. Die Berechnungen erfolgten mit dem Programm ASSAM und die Bilder wurden über das Programm PFRAME gezeichnet. Das Symbol o gibt die berechneten Werte und $\blacktriangle$ die experimentell gefundenen Werte wieder

Bild 21

Abhängigkeit des weißen Isoenzym von der Magnesiumkonzentration ohne Ausgleich der Ionenstärke

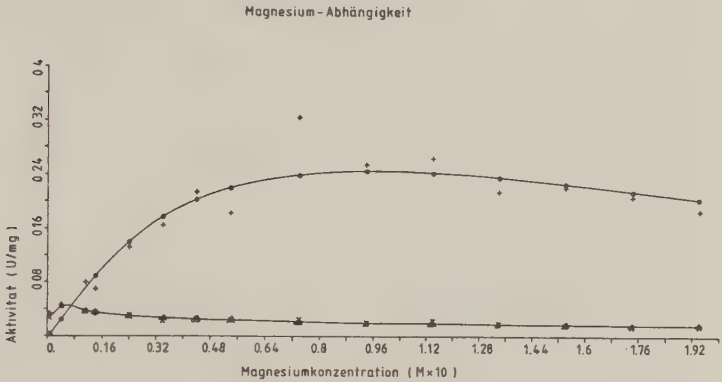


Bild 21a

Abhängigkeit der Aktivität A_0 (x) und A_1 (+) von der Mg^{2+} -Konzentration. Die Symbole o bzw. $\blacktriangle$ kennzeichnen die berechneten Werte.

Magnesium - Abhängigkeit

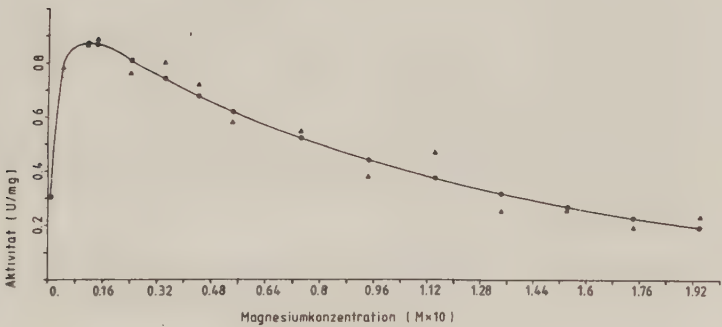


Bild 21b

Abhängigkeit der Aktivität A_2 von der Magnesiumkonzentration ohne Ausgleich der Ionenstärke

Die Magnesiumkonzentration wurde nach 2.2.1 über den Handtestpuffer (s. o.) eingestellt. Die Durchführung des Versuchs erfolgte unter gleichen Bedingungen wie oben und parallel dazu. Die berechneten Werte sind mit o, die experimentell ermittelten Werte mit $\blacktriangle$ gekennzeichnet.

3.3.4 Vergleich der Isoenzyme bei steigender Ammoniumionenkonzentration

Die Ergebnisse der Testreihe mit steigender Magnesiumkonzentration ohne Ionenstärkeausgleich lassen vermuten, daß die Ionenstärke einen nicht unerheblichen Einfluß auf die Aktivierung durch Magnesium hat. Gerade bei pH 6.8 mit 60 μM Calcium (A_1) wird beobachtet, wie die Aktivität bis 90 mM Mg^{2+} ansteigt, während dies mit Ionenstärkeausgleich nicht beobachtet werden kann.

Als Ion wird hier das Ammoniumion gewählt, das, wie schon früher beobachtet (16), eine stabilisierende Wirkung bei der Phosphorylase Kinase hat und andererseits auch einen ähnlichen Ionenradius wie das Kaliumion ($1.43 \text{ \AA}$ NH_4^+ und $1.33 \text{ \AA}$ K^+) (27), das ungefähr eine Konzentration von 100 mM im Intrazellulärraum hat. Das Ammoniumion kann auch schlecht mit Ca^{2+} oder Mg^{2+} kompetieren, da diese einen Ionenradius von $0.99 \text{ \AA}$ bzw. $0.65 \text{ \AA}$ besitzen (27). Das Magnesium ist um ein Drittel kleiner als das Calciumion und von daher gesehen kann man sich auch vorstellen, daß das Magnesium wohl Calciumbindungsstellen besetzen kann, aber nicht die Konformationsänderung bewirkt wie das größere Calciumion, sondern eher die Bindungsstelle für das Calciumion öffnet.

Die Testreihen werden nach 2.2.1 im Handtest durchgeführt, die Parameter mit dem Programm ASSAM nach 2.3.4 berechnet. Es ergeben sich folgende Werte:

Tabelle 11: Abhängigkeit der Aktivität der beiden Isoenzyme von der Ammoniumionenkonzentration

	: weisses	: rotes	: weisses	: rotes	:
	: Isoenzym	: Isoenzym	: Isoenzym	: Isoenzym	:
	: A_0	: A_0	: A_1	: A_1	:
$K_m' (\text{NH}_4\text{Cl})$	: 3.5×10^{-4}	: 7.5×10^{-4}	: -.-	: -.-	: M
V_{max}	: 0.06	: 0.03	: -.-	: -.-	: U/mg
K_i'	: 2.5×10^{-1}	: 4.6×10^{-1}	: 4.6×10^{-2}	: 9.2×10^{-2}	: M
Hillkoeff.	: 1.0	: 1.0	: 1.0	: 1.0	:

	: weisses	: rotes	:
	: Isoenzym	: Isoenzym	:
	: A ₂	: A ₂	:
K _m (NH ₄ Cl)	: 4.4x10 ⁻⁴	: -.-	: M
V _{max}	: 1.6	: -.-	: U/mg
K _i	: 5.2x10 ⁻¹	: 2.9x10 ⁻¹	: M
Hillkoeff.	: 1.0	: 1.0	:

Die Unterschiede zwischen rotem und weißem Isoenzym sind klein. Die A₀-Aktivität bleibt bis ca. 100 mM etwa gleich und sinkt dann langsam ab. Die Inhibitorkonstanten liegen bei dem roten wie bei dem weißen Isoenzym über 200 mM NH₄⁺. Die A₀-Aktivität ist demzufolge relativ insensitiv gegenüber einer Änderung der Ionenstärke (siehe Bild 22 und 23).

Die A₁-Aktivität zeigt eine hohe Sensibilität gegenüber einer Änderung der Ionenstärke und wird von Anfang an stark gehemmt. Sie beträgt bei 500 mM NH₄⁺ nur noch ein Zehntel der Anfangsaktivität.

Die A₂-Aktivität läßt sich durch die starke Streuung der Meßwerte im Bereich bis 100 mM NH₄⁺ nur schwer berechnen, sie ist aber in diesem Bereich im oberen Drittel ihrer Aktivität. Der Abfall von 100 bis 200 mM NH₄⁺ ist beim roten Isoenzym sehr viel stärker ausgeprägt als beim weißen. Das drückt sich auch in den K_i-Werten aus.

Bild 22

Abhängigkeit des roten Isoenzym von der NH_4Cl -Konzentration

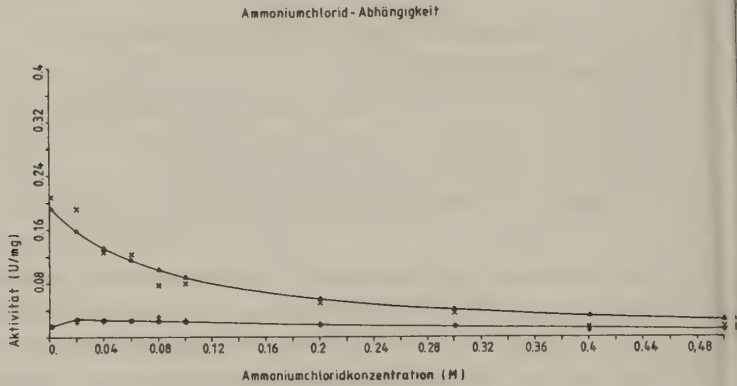


Bild 22a

Abhängigkeit der Aktivität A_0 (+) und A_1 (x) von der NH_4Cl Konzentration. o und ▲ kennzeichnen die berechneten Parameter

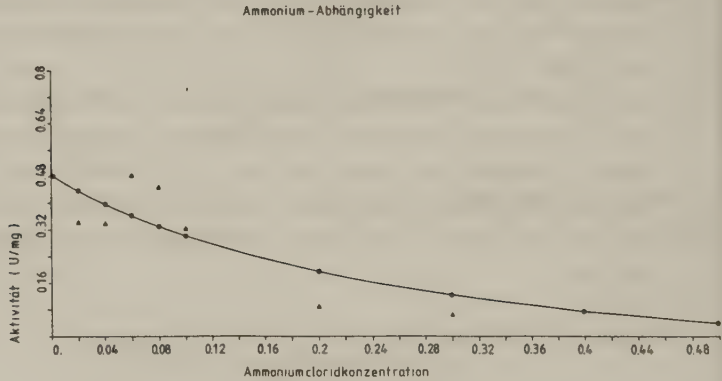


Bild 22b

Abhängigkeit der Aktivität A_2 von der Ammoniumionen-konzentration

Die Ammoniumchloridkonzentration nach 2.2.1 wurde über den Handtestpuffer (1.5 mM GP, 0.75 mM DTE, 6 mM EGTA für A_0 , zusätzlich 6.6 mM Ca^{2+} für A_1 und pH 8.6 für A_2) eingestellt. Die Kurven wurden über das Programm PFRAME gezeichnet. Die berechneten Werte (o) sind mit dem Programm ASSAM ermittelt worden, die experimentell gefundenen Werte (▲) streuen hier stark.

Bild 23

Abhängigkeit des weißen Isoenzym von der NH_4Cl -Konzentration

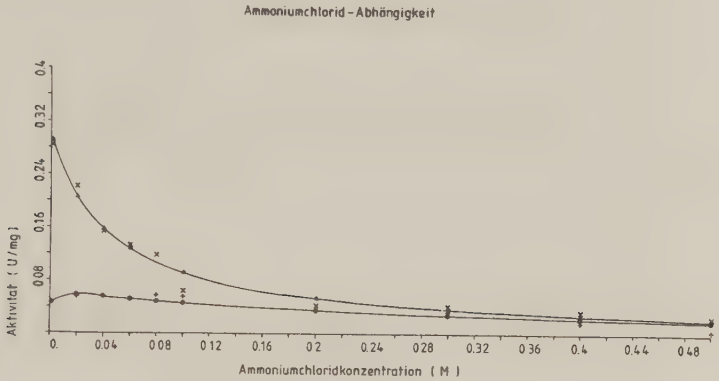


Bild 23a

Abhängigkeit der Aktivität A_0 (+) und A_1 (x) von der NH_4Cl -Konzentration. o und $\blacktriangle$ kennzeichnen die berechneten Parameter.

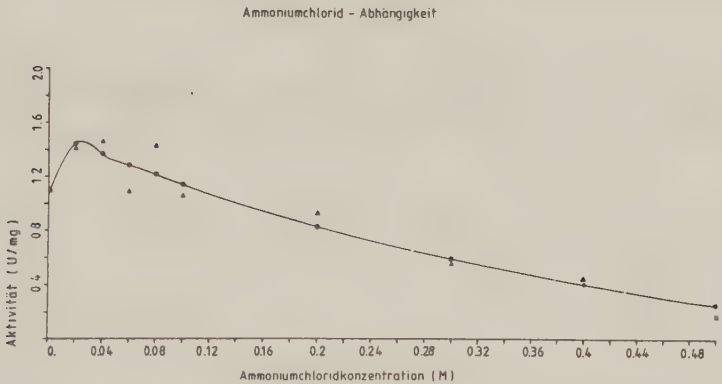


Bild 23b

Abhängigkeit der Aktivität A_2 von der Ammoniumionen-konzentration

Die Ammoniumchloridkonzentration nach 2.2.1 wurde über den Handtestpuffer (s. o.) eingestellt. Die Kurven wurden über das Programm PFRAME gezeichnet. Der Versuch wurde parallel zu dem oben gezeigten und unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die mit dem Programm ASSAM berechneten Werte sind mit o, die gemessenen Parameter mit $\blacktriangle$ gekennzeichnet.

3.3.5 Abhängigkeit der Aktivität der Isoenzyme von ATP/Mg^{2+}

Die beobachtete Kooperativität bei der A_2 -Aktivität gegenüber Calcium gibt Anlaß, ein derartiges Verhalten mit einem Substrat zu prüfen. Der Unterschied zum Calcium besteht darin, daß ATP/Mg^{2+} direkt am " Ort des Geschehens " binden muß und nicht über einen Mediator, das Calmodulin, nur sekundär auf die Phosphorylase Kinase wirken kann.

Die Versuchsreihen werden nach 2.2.1 getestet und mit dem Programm ASSAM (2.3.4) ausgewertet. Die Auftragung der Meßwerte ergibt die Bilder 24 und 25 (2.3.5). Die berechneten Parameter sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 12: Kinetische Parameter der ATP/Mg^{2+} -abhängigen Aktivierung

	: weisses : Isoenzym : A_1	: rotes : Isoenzym : A_1	: weisses : Isoenzym : A_2	: rotes : Isoenzym : A_2	:
$K_m (\text{ATP/Mg}^{2+})$	: 5.0×10^{-3}	: 6.7×10^{-3}	: 1.5×10^{-3}	: 1.6×10^{-3}	: M
$V_{\max}$	: 0.40	: 0.43	: 1.65	: 3.69	: U/mg
Hillkoeff.	: 1.2	: 0.8	: 1.8	: 1.7	:
K_i	: --	: --	: 2.64×10^{-2}	: 1.24×10^{-2}	: M

Die beiden Isoenzyme unterscheiden sich kaum voneinander. Die A_2 -Aktivität des weißen Isoenzym besitzt eine doppelt so hohe Maximalaktivität und einen doppelt so hohen K_i -Wert als das rote Isoenzym. Dieses hat eine geringere Hemmung durch hohe ATP/Mg^{2+} -Konzentrationen, aber auch einen geringeren $V_{\max}$ -Wert. Die Hillkoeffizienten sind erst bei pH 8.6 deutlich über 1.0 und zeigen, daß eine Kooperativität vorliegt. Gegenüber der A_1 -Aktivität steigt die Affinität zum Substrat um den Faktor 4. Ebenso wird die Inhibition erst bei pH 8.6 sichtbar.

Im Zusammenhang mit den Daten der Calcium-abhängigen Messungen erscheint nun eine Korrelation der Kooperativität mit der Steigerung der Affinität und der pH-Erhöhung möglich.

Bild 24

Abhängigkeit der Aktivität des roten Isoenzym
von der ATP/Mg^{2+} -Konzentration

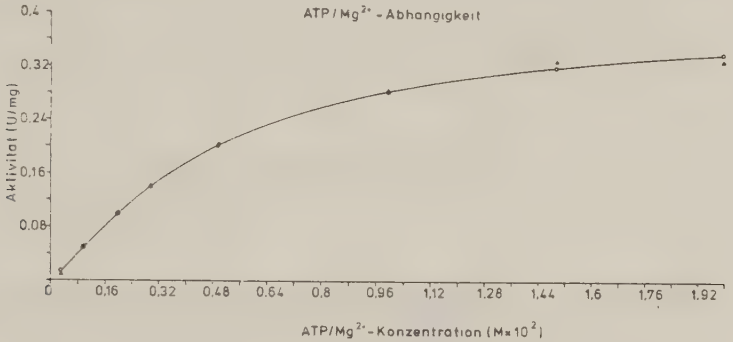


Bild 24a

Abhängigkeit der Aktivität A_1 von der ATP/Mg^{2+} -Konzentration. Die Symbole $\blacktriangle$ und $\circ$ kennzeichnen die experimentell gefundenen bzw. die berechneten Parameter.

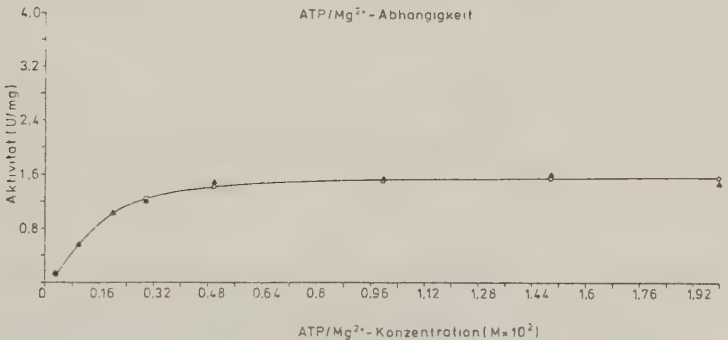


Bild 24b

Abhängigkeit der Aktivität A_2 von der ATP/Mg^{2+} -Konzentration.

Die ATP/Mg^{2+} -Konzentration wurde nach 2.2.1 über den ATP/Mg-Testpuffer eingestellt (1.5 mM GP, 0.75 mM DTE, pH 6.8 für A_1 und pH 8.6 für A_2). Der Hand-testpuffer enthält 1.5 mM GP, 0.75 mM DTE, 100 mM NH_4Cl , 6 mM EGTA, pH 6.8 für A_0 , zusätzlich 6.6 mM Ca^{2+} für A_1 und pH 8.6 für A_2 . Die Kurven wurden über das Programm PFRAME gezeichnet. $\circ$ kennzeichnet die mit dem Programm ASSAM berechneten und $\blacktriangle$ die experimentell ermittelten Werte.

Bild 25

Abhängigkeit der Aktivität des weißen Isoenzym
von der ATP/Mg^{2+} -Konzentration

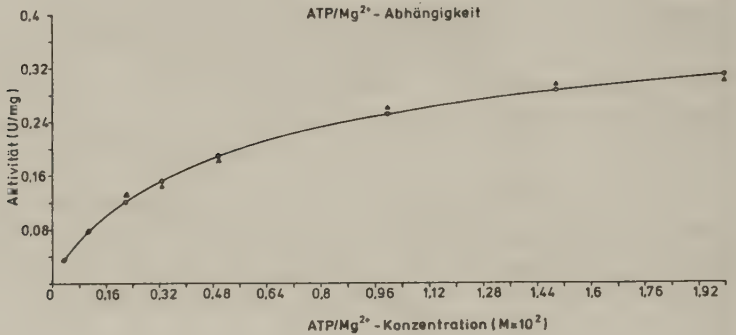


Bild 25a

Abhängigkeit der Aktivität A_1 von der ATP/Mg^{2+} -Konzentration.
Das Symbol o kennzeichnet die berechneten und $\blacktriangle$ die gemessenen
Parameter.

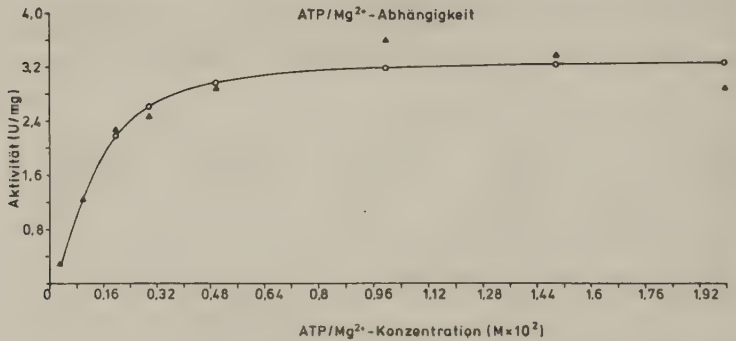


Bild 25b

Abhängigkeit der Aktivität A_2 von der ATP/Mg^{2+} -Konzentration.

Der Versuch wurde unter den gleichen Bedingungen, parallel wie oben durchgeführt. Die ATP/Mg^{2+} -Konzentration wurde über den ATP/Mg -Testpuffer (s. o.) eingestellt. Die Auswertung erfolgte über das Programm ASSAM und die Kurven wurden über das Programm PFRAME gezeichnet. Das Zeichen o stellt die berechneten und $\blacktriangle$ die gemessenen Werte dar.

3.3.6 Abhängigkeit der Aktivität der Isoenzyme von dem Substrat Phosphorylase b

Die bisherigen Versuche haben homotrope Kooperativität jeweils zwischen Ca^{2+} , Mg^{2+} und ATP/Mg^{2+} gezeigt. Es bleibt zu untersuchen welche Kooperativität im Hinblick auf das Proteinsubstrat, Phosphorylase b, besteht. Weiterhin soll für ein Substrat-Effektor-Paar geprüft werden, ob an dem Enzym auch heteroep Kooperativität aufzufinden ist. Als Paar wird Mg^{2+} -Phosphorylase b ausgewählt. Diese Eigenschaft wird bei allen Partialaktivitäten und beiden Isoenzymen geprüft.

3.3.6.1 Vergleich der calciumabhängigen Partialaktivitäten bei 0.6 mM Mg^{2+}

Die Testreihen werden mit beiden Isoenzymen unter gleichen Bedingungen (2.2.1) nacheinander durchgeführt. Die Daten werden nach 2.3.4 mit dem Computer ausgewertet und nach 2.3.5 die Bilder gezeichnet. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die berechneten Parameter:

Tabelle 13: Kinetische Parameter der Phosphorylase b-abhängigen Aktivierung

	: weisses : Isoenzym : A_0	: rotes : Isoenzym : A_0	: weisses : Isoenzym : A_1	: rotes : Isoenzym : A_1	:
K_m (Phos.b):	1.1×10^{-4}	1.1×10^{-4}	6.7×10^{-5}	5.1×10^{-5}	M
$V_{\max}$	0.06	0.03	0.05	0.03	U/mg
Hillkoeff.	1.4	1.2	1.7	1.5	:
	: weisses : Isoenzym : A_2	: rotes : Isoenzym : A_2	:		
K_m (Phos.b):	5.9×10^{-5}	5.1×10^{-5}	M		Phos. b = Phosphorylase b
$V_{\max}$	2.11	1.09	U/mg		
Hillkoeff.	1.8	1.8	:		

Die K_m -Werte der beiden Isoenzyme liegen entsprechend der jeweiligen Partialaktivität im gleichen Bereich.

Bei den V_{max} -Werten kann man Unterschiede erkennen. Die A_0 -, A_1 - und A_2 -Aktivität ist beim roten Isoenzym nur etwa halb so groß wie bei dem weißen Isoenzym.

Im Gegensatz zum Substrat ATP/Mg^{2+} weisen alle Partialaktivitäten bei beiden Isoenzymen einen Hillkoeffizienten größer als 1. auf, der Kooperativität anzeigt.

Das weiße Isoenzym weist noch eine Besonderheit auf: Seine A_1 -Aktivität ist kleiner als die A_0 -Aktivität.

Bild 26

Abhängigkeit der Aktivität des roten Isoenzym
von der Konzentration der Phosphorylase b bei
0.6 mM Mg^{2+}

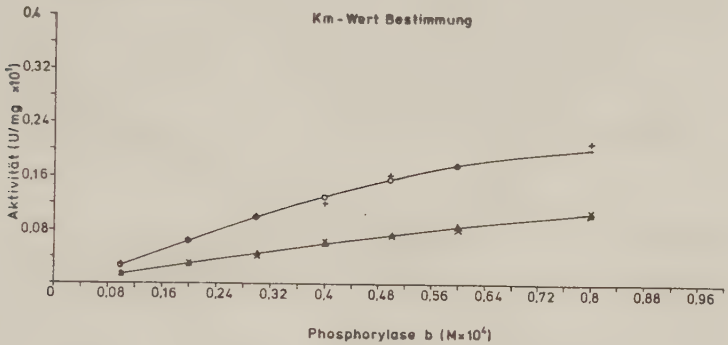


Bild 26a

Abhängigkeit der Aktivität A_0 (x) und A_1 (+) von der
Konzentration der Phosphorylase b. Die berechneten Werte
werden mit $\blacktriangle$ bzw o gekennzeichnet.

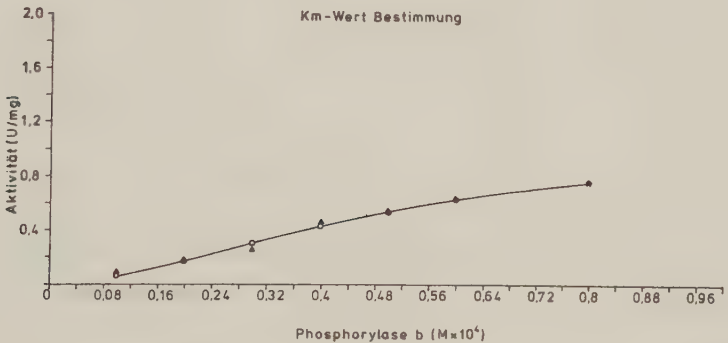


Bild 26b

Abhängigkeit der Aktivität A_2 von der Konzentration der
Phosphorylase b.

Das Experiment wurde nach 2.2.1 durchgeführt. Die Phosphorylase b wurde über den Substratpuffer (1.5 mM GP, 0.75 mM DTE, 100 mM NH_4Cl , pH 7.0) eingestellt. Der Handtestpuffer enthält 1.5 mM GP, 0.75 mM DTE, 100 mM NH_4Cl , 6mM EGTA, pH 6.8 für A_0 , zusätzlich 6.6 mM Ca^{2+} für A_1 und pH 8.6 für A_2 . Die theoretischen Werte (o) wurden mit dem Programm ASSAM ermittelt und zusammen mit den experimentell gefundenen ($\blacktriangle$) über das Programm PFRAME in das Diagramm gezeichnet.

Bild 27

Abhängigkeit des weißen Isoenzym von der
Konzentration der Phosphorylase b bei 0.6 mM Mg^{2+}

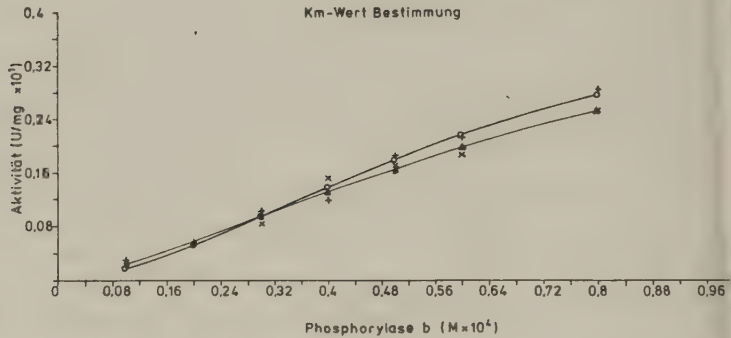


Bild 27a

Abhängigkeit der Aktivität A_0 (x) und A_1 (+) von der
Konzentration der Phosphorylase b. Die berechneten Werte
werden mit $\blacktriangle$ bzw o gekennzeichnet.

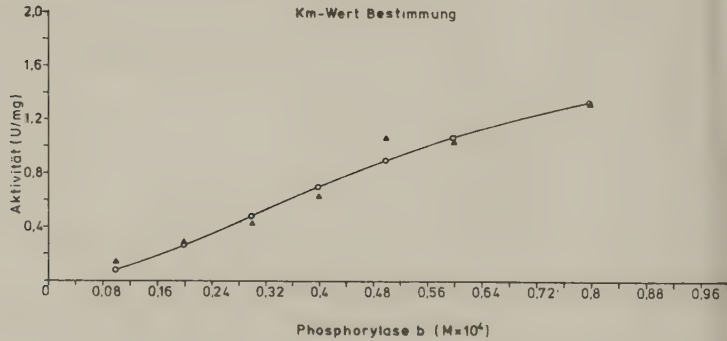


Bild 27b

Abhängigkeit der Aktivität A_2

Der Versuch wurde nach 2.2.1 parallel zum Experiment oben durchgeführt. Die Konzentration der Phosphorylase b wurde über den Substratpuffer eingestellt (s. o.). Die Berechnung der Daten wurde mit dem Programm ASSAM durchgeführt, die Bilder über das Programm PFRAME gezeichnet. Das Zeichen $\blacktriangle$ symbolisiert die gemessenen und o die berechneten Werte.

3.3.6.2 Vergleich der calciumabhängigen Partialaktivitäten bei 1.6 mM Mg^{2+}

Die vorherige Versuchsreihe(3.3.6.1) wurde mit einer höheren Magnesiumkonzentration von 1.6 mM Mg^{2+} im Testansatz wiederholt. Diese Konzentration reicht aus, die Aktivitäten A_0 und A_2 maximal zu stimulieren, dagegen wird A_1 nur halbmaximal stimuliert. Die Magnesiumkonzentration wird mit dem Programm COMICS (2.3.1) berechnet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle 14: Kinetische Parameter der Phosphorylase b-abhängigen Aktivierung bei 1.6 mM Mg^{2+}

	: weisses : Isoenzym : A_0	: rotes : Isoenzym : A_0	: weisses : Isoenzym : A_1	: rotes : Isoenzym : A_1	:
K_m (Phos.b)	: 1.1×10^{-4}	: 1.5×10^{-4}	: 6.3×10^{-5}	: 9.6×10^{-5}	: M
V_{max}	: 0.17	: 0.08	: 0.16	: 0.18	: U/mg
Hillkoeff.	: 1.0	: 1.0	: 1.5	: 1.1	:

	: weisses : Isoenzym : A_2	: rotes : Isoenzym : A_2	:
K_m (Phos.b)	: 5.1×10^{-5}	: 5.7×10^{-5}	: M
V_{max}	: 2.19	: 2.01	: U/mg
Hillkoeff.	: 1.0	: 1.1	:

Phos. b = Phosphorylase b

Die K_m -Werte der A_0 - und A_2 -Aktivität der beiden Isoenzyme liegen im gleichen Bereich. Die A_1 -Aktivität des roten Isoenzym hat einen 50% größeren K_m -Wert als das weiße Isoenzym. Die V_{max} -Werte liegen bei der A_1 - und A_2 -Aktivität im gleichen Bereich. Die A_0 -Aktivität des roten Isoenzym ist aber nur etwa halb so groß wie die des weißen Isoenzym.

Die beiden Partialaktivitäten A_0 und A_2 beider Isoenzyme zeigen einen Hillkoeffizienten nahe bei 1.0, so daß bei diesen Aktivitäten keine Kooperativität mehr zu beobachten ist, dagegen zeigt die A_1 -Aktivität noch deutliche Kooperativität.

Der Abstand der A_1 -Aktivität des weißen Isoenzym zu der A_0 -Aktivität ist gegenüber der Testreihe 3.3.6.1 etwas geringer geworden.

Bild 28

Abhängigkeit der Aktivität des roten Isoenzym
von der Konzentration der Phosphorylase b bei
1.6 mM Mg^{2+}

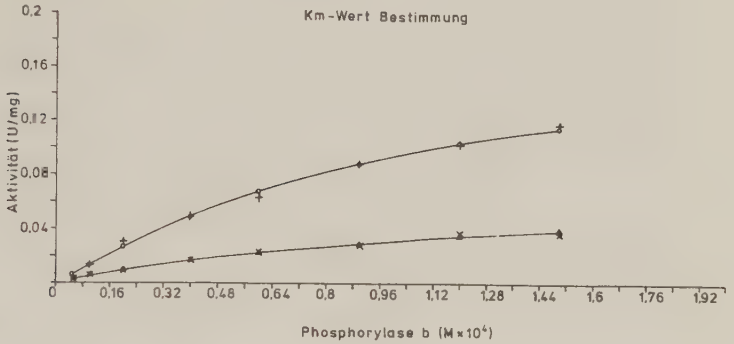


Bild 28a

Abhängigkeit der Aktivität A_0 (x) und A_1 (+) von der Phos-
phorylase b-Konzentration. Die Symbole $\blacktriangle$ und o kennzeichnen
die berechneten Werte

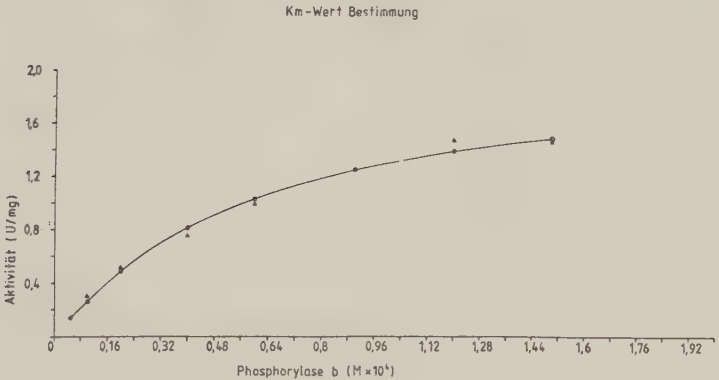


Bild 28b

Abhängigkeit der Aktivität A_2 von der Konzentration der
Phosphorylase b

Der Test wurde nach 2.2.1 durchgeführt. Die Phosphorylase b-Konzentration wurde über den Substratpuffer (s. o.) eingestellt. Der Handtestpuffer enthält 1.5 mM GP, 0.75 mM DIE, 100 mM NH_4Cl , 6 mM EGTA, 6 mM Mg^{2+} , pH 6.8 für A_0 , zusätzlich 6.6 mM Ca^{2+} für A_1 und pH 8.6 für A_2 . Die Punkte der Ausgleichskurve (o) werden mit dem Programm ASSAM errechnet und zusammen mit den gemessenen Punkten ($\blacktriangle$) mit dem Programm PFRAME gezeichnet.

Bild 29

Abhängigkeit der Aktivität des weißen Isoenzym
von der Konzentration der Phosphorylase b bei
 1.6 mM Mg^{2+}

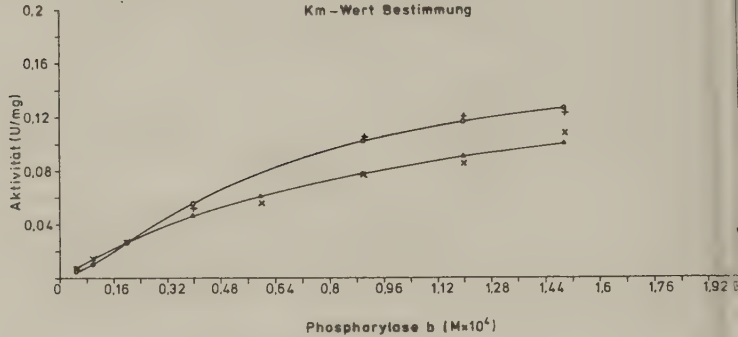


Bild 29a

Abhängigkeit der Aktivität A_0 (x) und A_1 (+) von der Konzentration der Phosphorylase b. Die Zeichen Δ und o symbolisieren die berechneten Parameter.

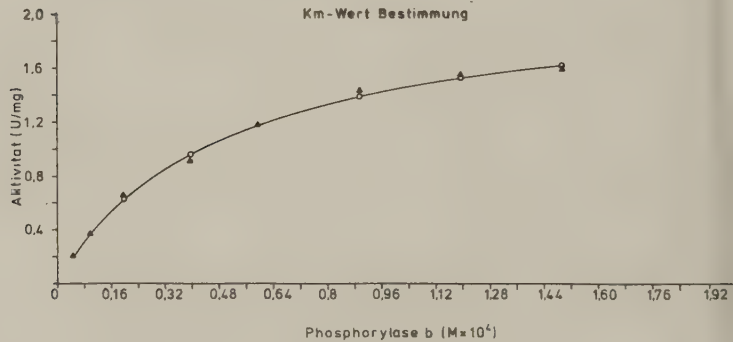


Bild 29b

Abhängigkeit der Aktivität A_2 von der Phosphorylase b-Konzentration

Der Versuch wurde nach 2.2.1 parallel zu dem obigen durchgeführt. Die Phosphorylase b-Konzentration wurde mit dem Substratpuffer eingestellt (s. o.). Die Daten wurden mit dem Programm ASSAM ausgewertet und über das Programm PFRAME gezeichnet. Die berechneten Werte sind mit dem Zeichen o, die gemessenen mit Δ gekennzeichnet.

3.3.6.3 Vergleich der calciumabhängigen Partialaktivitäten bei 14 mM Mg^{2+}

Die vorherige Testreihe wird nochmals mit 14 mM Mg^{2+} wiederholt, um alle drei Partialaktivitäten maximal zu stimulieren, da die bisher beobachteten Partialaktivitäten A_0 , A_1 und A_2 bei niedrigen Magnesiumkonzentrationen offensichtlich anders ausgedrückt werden als bei höheren. Die K_m -Werte, V_{max} -Werte und Hillkoeffizienten sollten die Entwicklung der Partialaktivitäten im Hinblick auf die Magnesiumkonzentration aufzeigen.

Die Testansätze werden nach 2.2.1 mit 14 mM Mg^{2+} eingestellt (nach 2.3.1 berechnet), die Meßwerte mit dem Programm ASSAM (2.3.4) ausgewertet und in der Tabelle 15 und den Bildern 30 und 31 gezeigt.

Tabelle 15: Kinetische Parameter der Phosphorylase b-abhängigen Aktivierung bei 14 mM Mg^{2+}

	: weisses : Isoenzym : A_0	: rotes : Isoenzym : A_0	: weisses : Isoenzym : A_1	: rotes : Isoenzym : A_1	:
K_m (Phos.b)	: 4.5×10^{-5}	: 3.3×10^{-5}	: 1.1×10^{-4}	: 9.0×10^{-5}	: M
V_{max}	: 0.09	: 0.04	: 0.27	: 0.36	: U/mg
Hillkoeff.	: 1.0	: 1.2	: 0.9	: 1.0	:

	: weisses : Isoenzym : A_2	: rotes : Isoenzym : A_2	:
K_m (Phos.b)	: 2.2×10^{-5}	: 2.4×10^{-5}	: M
V_{max}	: 2.47	: 1.92	: U/mg
Hillkoeff.	: 1.2	: 1.0	:

Phos.b = Phosphorylase b

Die K_m -Werte der Partialaktivitäten beider Isoenzyme liegen wieder im gleichen Bereich. Im Vergleich mit den beiden vorherigen Meßreihen (3.3.6.1 und 3.3.6.2) sind die K_m -Werte der A_0 - und A_2 -Aktivität kleiner geworden. Die K_m -Werte der A_1 -Aktivität sind dagegen größer geworden.

Die V_{max} -Werte der A_0 - und der A_2 -Aktivität des roten Isoenzym sind kleiner als die des weißen Isoenzym, bei der A_1 -Aktivität hat das rote Isoenzym dagegen einen größeren V_{max} -Wert.

Die Hillkoeffizienten haben alle einen Wert um 1.0 und man kann keine Kooperativität mehr feststellen. Die Entwicklung der Hillkoeffizienten der Testreihen bei 0.6 mM, 1.6 mM und 14 mM Mg^{2+} weist auf positive heterotrope Kooperativität zwischen Mg^{2+} und Phosphorylase b hin.

Der Abstand der A_1 -Aktivität von der A_0 -Aktivität ist größer geworden als in den vorangegangenen Meßreihen (3.3.6.1 und 3.3.6.2). Die A_1 -Aktivität des roten Isoenzym ist etwa zehnmal, die A_1 -Aktivität des weißen Isoenzym etwa dreimal so groß wie die entsprechende A_0 -Aktivität.

Das Verhalten des roten Isoenzym weicht hier deutlich von dem des weißen Isoenzym ab.

Bild 30

Abhängigkeit der Aktivität des roten Isoenzym
von der Konzentration der Phosphorylase b bei
14 mM Mg^{2+}

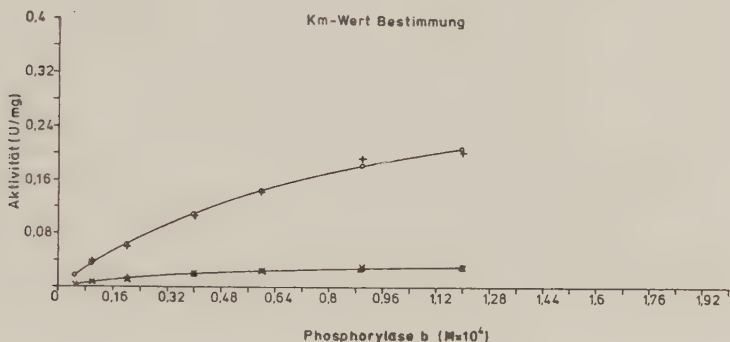


Bild 30a

Abhängigkeit der A_0 -Aktivität (x) und der A_1 -Aktivität (+)
von der Phosphorylase b-Konzentration. $\blacktriangle$ und $\circ$ stellen die
berechneten Parameter dar.

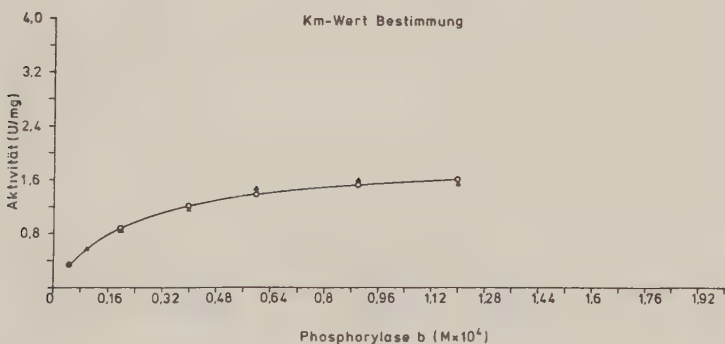


Bild 30b

Abhängigkeit der Aktivität A_2 von der Konzentration der Phos-
phorylase b

Die Phosphorylase b-Konzentration wurde über den Substratpuffer (s. o.)
eingestellt. Der Versuch wurde wie in 2.2.1 durchgeführt. Der Handtestpuffer
enthält 1.5 mM GP, 0.75 mM DIF, 100 mM NH_4Cl , 6 mM EGTA, 84 mM Mg^{2+} , pH 6.8
für A_0 , zusätzlich 6.6 mM Ca^{2+} für A_1 und pH 8.6 für A_2 . Der Testansatz ent-
hält so 14 mM Mg^{2+} (frei). Die Symbole $\circ$ stellen die mit dem Programm ASSAM
errechneten, $\blacktriangle$ die experimentell gemessenen Parameter dar. Die Bilder wurden
mit dem Programm PFRAME gezeichnet.

Bild 31

Abhängigkeit der Aktivität des weißen Isoenzym
von der Konzentration der Phosphorylase b bei
14 mM Mg^{2+}

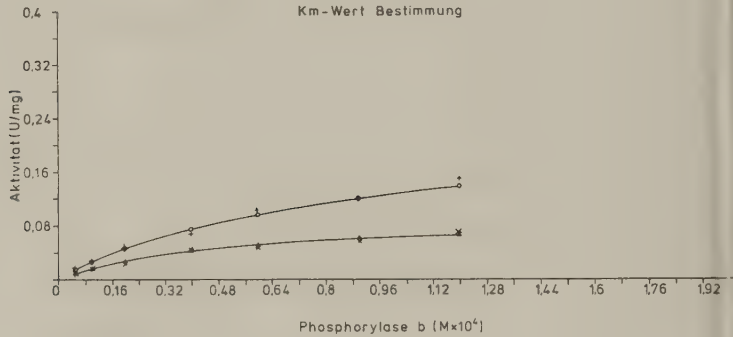


Bild 31a

Abhängigkeit der Aktivität A_0 (x) und A_1 (+) von der Kon-
zentration der Phosphorylase b. Die berechneten Werte sind m
▲ bzw. o gekennzeichnet.

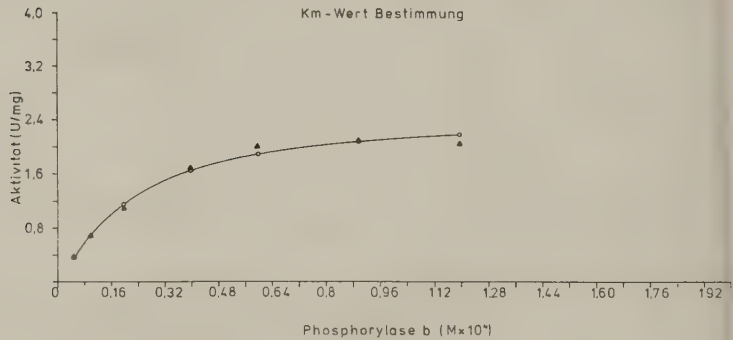


Bild 31b

Abhängigkeit der Aktivität A_2 von der Konzentration der Phos-
phorylase b

Die Durchführung des Versuchs erfolgte unter gleichen Bedingungen und parallel wie oben. Die Magnesiumkonzentration wurde durch den Handtest-
puffer (s. o.) auf 14 mM (frei) im Testansatz eingestellt. Die
Phosphorylase b-Konzentration wurde über den Substratpuffer variiert (s. o.)
Die Zeichen o stellen die berechneten, ▲ die gemessenen Werte dar.

3.3.7 Aktivierung der Isoenzyme durch Calmodulin in Abhängigkeit der Calmodulinkonzentration

Die Phosphorylase Kinase hat, wie oben schon erwähnt, ausser dem fest einbezogenen Calmodulin noch die Möglichkeit ein oder mehrere weitere Calmodulinmoleküle zu binden. Die Reinigung des roten bzw. auch des weissen Isoenzym basiert auf dieser Eigenschaft. Die Funktion der Calmodulinbindung ist noch umstritten. Cohen et al. (63) zeigten eine bis zu siebenfache Steigerung der Aktivität, andere beobachteten wiederum kaum einen Effekt (64). Da das rote Isoenzym nur mit einer zehnfach kleineren Kapazität an der Calmodulin-Sepharose bindet, wäre also auch eine weitere Differenzierung der beiden Isoenzyme über ihre Calmodulinaktivierbarkeit zu erwarten.

Die Testreihe wird mit Calmodulinkonzentrationen von 1×10^{-12} M bis 4×10^{-7} M bei einer Phosphorylase Kinase-Konzentration von 1.66×10^{-10} M bei A_2 (weisses Isoenzym) und 1.66×10^{-9} M bei A_1 und 1.46×10^{-10} M bei A_2 (rotes Isoenzym) und 1.46×10^{-9} M bei A_1 durchgeführt. Die Bedingungen sind in 2.2.1 beschrieben. Die Berechnung der kinetischen Parameter wird nach 2.3.4 mit dem Programm ASSAM durchgeführt. Die Parameter sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 16 Kinetische Parameter der Calmodulin-abhängigen Aktivierung und Inhibition

	: weisses : Isoenzym : A_1	: rotes : Isoenzym : A_1	: weisses : Isoenzym : A_2	: rotes : Isoenzym : A_2	:
V_0	: 0.07	: 0.04	: -.-	: -.-	: U/mg
$K_m' (Cm)$	: 8.7×10^{-8}	: 3.4×10^{-8}	: 4.1×10^{-9}	: 2.4×10^{-9}	: M
V_{max}	: 0.05	: 0.03	: 2.48	: 0.69	: U/mg
K_i'	: -.-	: -.-	: 1.7×10^{-9}	: 1.9×10^{-9}	: M

Cm = Calmodulin

Die Bilder 32 und 33 (nach 2.3.5) zeigen das ähnliche Verhalten der beiden Isoenzyme gegenüber Calmodulin.

Die A_1 -Aktivität wird von einer Grundaktivität aus berechnet, deren Parameter V_0 ist.

Bei pH 6.8 werden beide Isoenzyme ab ca. 10^{-8} M Calmodulin jeweils zweifach stimuliert. Das rote Isoenzym wird ab 10^{-7} M Calmodulin nicht weiter aktiviert, während das weiße noch nicht in den Sättigungsbereich gekommen ist. Bei beiden Isoenzymen beginnt die Aktivierung erst mit dem zehnfachen Überschuß an Calmodulin über Phosphorylase Kinase. Selbst wenn die Phosphorylase Kinase als Monomer betrachtet wird, - es ergibt sich dann eine vierfach höhere Konzentration an Phosphorylase Kinase - bleibt doch ein Faktor von 2.5 . Die halbmaximale Aktivierung erfolgt erst bei einem 23-fachen Überschuß von Calmodulin, auf das Tetramere bezogen, oder einem 6-fachen Überschuß, auf das Monomer bezogen. Diese Werte gelten für das rote Isoenzym, beim weißen Isoenzym werden sie etwa verdoppelt: 52-facher Überschuß an Calmodulin, auf das Tetramer bezogen, und 13-facher Überschuß, auf das Monomer bezogen.

Hier ergibt sich die Frage, ob dieser Vorgang, der als so spezifisch für die Phosphorylase Kinase geschildert wird (63), nicht auf einfache hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Calmodulin zurückzuführen ist.

Die Testserie bei pH 8.6 (A_2) zeigt ein weniger eindeutiges Bild (33). Nach einem anfänglich konstanten Aktivitätsverlauf erfolgt bei beiden Isoenzymen ein Aktivitätsverlust von ca. 30%. Der sich daran anschließende Anstieg der Aktivität ist bei der höchsten Calmodulinkonzentration noch nicht abgeschlossen. Vergleicht man diesen Aktivitätsverlauf nach stöchiometrischen Gesichtspunkten, so ist zu erkennen, daß die Hemmung des Enzyms bei einem 10-fachen Überschuß (bezogen auf das Tetramer) von Calmodulin erfolgt. Bei einem 20-fachen Überschuß wird das Enzym dagegen schon halbmaximal aktiviert (16-fach bezogen auf das rote, 25-fach bezogen auf das weiße Isoenzym).

Bild 32

Abhängigkeit der Aktivität des roten Isoenzym
von der Konzentration exogen zugegebenen
Calmodulins

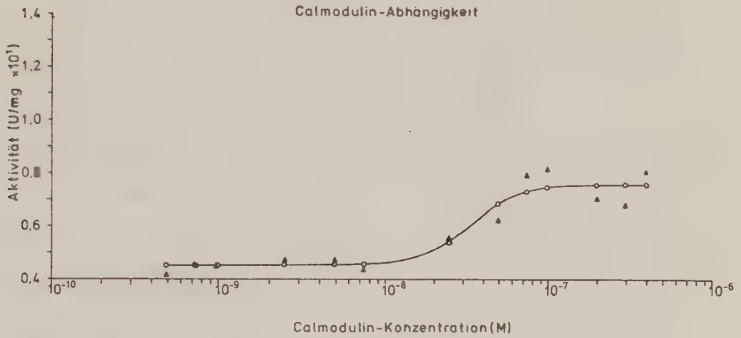


Bild 32a

Abhängigkeit der Aktivität A_1 von der Calmodulinkonzentration
o kennzeichnet die berechneten, $\blacktriangle$ die gemessenen Parameter.

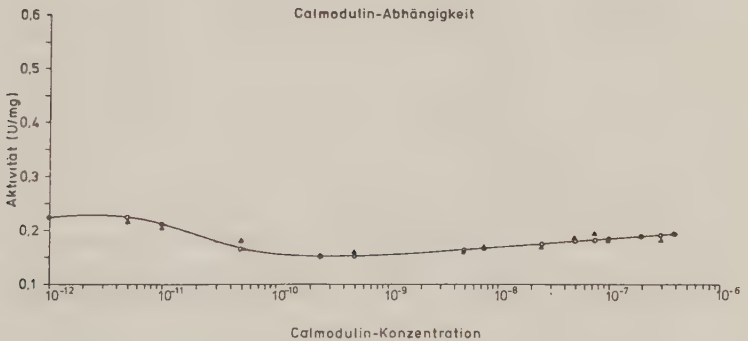


Bild 32b

Abhängigkeit der Aktivität A_2 von der Calmodulinkonzentration

Das Calmodulin wurde mit dem Handtestpuffer in den Testansatz eingebracht (1.5 mM GP, 0.75 mM DTE, 100 mM NH_4Cl , pH 6.8 bzw. 8.6). Die Durchführung erfolgte wie in 2.2.1 beschrieben. Die Berechnung der Ausgleichskurven wurde mit dem Programm ASSAM ausgeführt und mit dem Programm PFRAME gezeichnet. Die Symbole o kennzeichnen die berechneten, $\blacktriangle$ die gemessenen Werte.

Bild 33

Abhängigkeit der Aktivität des weißen Isoenzyms
von der Konzentration exogen zugegebenen Calmodulins

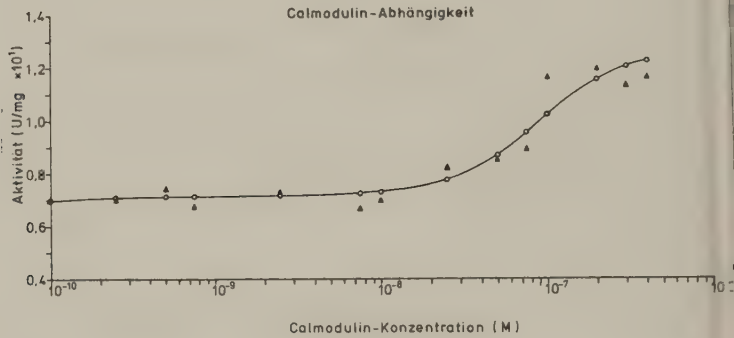


Bild 33a

Abhängigkeit der Aktivität A_1 von der Calmodulinkonzentration
o kennzeichnet die berechneten, ▲ die gemessenen Parameter.

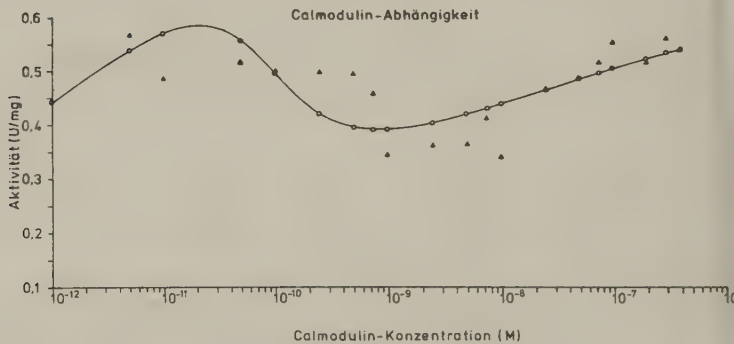


Bild 33b

Abhängigkeit der Aktivität A_2 von der Calmodulinkonzentration

Die Calmodulinkonzentration wurde mit dem Handtestpuffer (s. o.) eingestellt. Der Versuch wurde nach 2.2.1 parallel zum obigen durchgeführt. Die Berechnung der Ausgleichskurven wurde mit dem Programm ASSAM ausgeführt und mit dem Programm PFRAME gezeichnet. Die berechneten Werte sind mit o, die gemessenen mit ▲ gekennzeichnet.

4. Diskussion

Die Charakterisierung der Phosphorylase Kinase erfolgt bisher mit einem gereinigten Enzym aus gemischtem Muskel, das die Untereinheiten α , α' , β , γ und δ enthält (14).

Jennissen und Heilmeyer (3) zeigten als erste, daß die α' -Untereinheit zu einem Isoenzym der Phosphorylase Kinase gehört, das aus der roten Muskulatur gewonnen werden kann.

Die Charakterisierung dieses roten Isoenzym und der Vergleich mit dem Isoenzym aus weißem Muskel kann ein Weg sein, die komplexe Funktion des Enzyms Phosphorylase Kinase aufzuklären. Das Isoenzym aus Rinderherzmuskel wurde von Cooper (6) und Killilea (33) isoliert und charakterisiert. Es enthält, wie das Isoenzym aus rotem Kaninchenskelettmuskel, die α' , β -, γ - und δ -Untereinheiten im Verhältnis 1:1:1:1. Die kinetischen Daten zeigen keine großen Unterschiede zum Isoenzym aus gemischtem Kaninchenskelettmuskel, wobei ein direkter Vergleich auf Grund der Herkunft dieses Enzyms aus einer anderen Tierspezies schwierig ist (siehe unten).

Die Aktivität des phosphorylierten roten Isoenzym ist etwa zwei- bis dreifach erhöht, im Vergleich zur mindestens zehnfachen Aktivierung des weißen Isoenzym (16).

Tam et al. (32) konnten aus rotem Rinderskelettmuskel das rote Isoenzym der Phosphorylase Kinase mit Hilfe der Calmodulin-Sepharose präparieren. Dieses Isoenzym enthält ebenfalls statt der α - die α' -Untereinheit. Die bekannten Differenzen zum weißen Isoenzym aus Kaninchenskelettmuskel sind ebenfalls klein. Die bisherigen Messungen zeigen, daß bei beiden Isoenzymen eine sehr ähnliche pH-Abhängigkeit besteht, beide Isoenzyme erreichen ein Maximum ihrer Aktivität bei pH 9.0.

Die Aktivierung durch Calcium weist gleiche K_m' -Werte im Bereich von 1 - 10 μ M Calcium auf. Die Phosphorylierung erfolgt mit der cAMP-abhängigen Proteinkinase zuerst an der β - und dann an der α' -Untereinheit. Die Aktivität steigt dabei parallel zum Einbau des Phosphats in das Enzym an. Die autokatalytische Phosphorylierung erfolgt überwiegend erst an der α' - und dann an der β -Untereinheit. Die Calmodulin-Aktivierbarkeit ist signifikant kleiner als beim Isoenzym aus gemischtem Muskel. Wiederum sind diese Ver-

gleiche zwischen weißem Isoenzym aus Kaninchenskelettmuskel und rotem Isoenzym aus Rinderskelettmuskel nur bedingt aussagekräftig, da auch die Struktur des roten Isoenzyms aus rotem Kaninchenskelettmuskel nicht mit der Struktur des roten Isoenzyms aus rotem Rinderskelettmuskel übereinstimmt. Die Untereinheiten α' und β aus Rindermuskel weisen ein höheres Molekulargewicht auf als aus Kaninchenskelettmuskel (65).

Ein direkter Vergleich ist deshalb nur zwischen den beiden Isoenzymen aus der gleichen Tierspezies und gleichartigem Muskel möglich.

In dieser Arbeit kann gezeigt werden, daß das rote Isoenzym der Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel über hydrophobe Chromatographie, Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie und schließlich Affinitätschromatographie an der Calmodulin-Sepharose als homogenes Protein dargestellt werden kann (siehe Kapitel 3.2).

Die Charakterisierung des Isoenzyms der Phosphorylase Kinase aus rotem Muskel erfolgt im Hinblick auf allosterische Effektoren wie Calcium und Magnesium und auf die Substrate ATP/Mg^{2+} und Phosphorylase b.

Die Messungen wurden parallel mit dem Enzym aus gemischtem Muskel vorgenommen, um einen direkten Vergleich zwischen diesem und dem roten Isoenzym unter gleichen Versuchsbedingungen zu erhalten. Beide Isoenzyme wurden vor den Messungen über Affinitätschromatographie auf der Calmodulin-Sepharose gereinigt, damit eventuelle Unterschiede durch die verschiedenartigen Präparationsmethoden ausgeglichen werden. Dies ist besonders wichtig im Hinblick auf das Proteinsubstrat, Phosphorylase b, da mit unterschiedlichen Präparationen bis zu maximal zweifach unterschiedliche spezifische Aktivitäten der Phosphorylase Kinase bestimmt werden. Beide Isoenzyme enthalten Calmodulin als fest eingebaute δ -Untereinheit (14) (3.2.2), die der Phosphorylase Kinase die Calciumsensitivität verleiht. Wie der Verlauf der Aktivität in Abhängigkeit von der freien Calciumkonzentration zeigt (Bild 17), werden beide Isoenzyme in gleicher Weise mit annähernd gleichen K_m' -Werten aktiviert. Beide Isoenzyme drücken bei pH 6.8 die Partialaktivitäten A_0 und A_1 und bei pH 8.6 die Partialakti-

vitäten A_0 , A_1 und A_2 aus. Der Hauptunterschied zwischen beiden Isoenzymen liegt in den gemessenen $V_{\max}$ -Werten (Tabelle 8) . Mit Ausnahme der A_1 -Aktivität bei pH 6.8 sind die $V_{\max}$ -Werte des weißen Isoenzym größer als die des roten Isoenzym.

Die Ähnlichkeit der Calciumaktivierung beider Isoenzyme spricht dafür, daß das endogene Calmodulin in beiden Enzymen wahrscheinlich identisch ist. Dafür spricht auch die beinahe vollständige Homologie der Primärsequenz des Calmodulins aus Phosphorylase Kinase mit der aus Gehirn (66). Nur die Umsetzung des " Signals " der Ca^{2+} -Bindung an Calmodulin auf die Aktivität macht sich bei beiden Isoenzymen in einer unterschiedlichen Aktivierung bemerkbar. Die Abstufung der Partialaktivitäten A_0 und A_1 bei pH 6.8 ist charakteristisch bei beiden Isoenzymen verschieden. Der Quotient aus A_0 und A_1 beträgt beim roten Isoenzym 0.09 und beim weißen Isoenzym 0.4 . Partielle Proteolyse kann für die erhöhte A_1 -Aktivität des roten Isoenzym ausgeschlossen werden, da bei proteolytisch angedauter Phosphorylase Kinase auch die Grundaktivität A_0 erhöht wird (16), was hier nicht zu beobachten ist.

Vergleicht man den Verlauf der Aktivierung bei pH 6.8 mit der bei pH 8.6, so sieht man, daß die halbmaximale Aktivierung für A_1 bei pH 8.6 schon bei einer 100-mal niedrigeren Calciumkonzentration erfolgt als bei pH 6.8. Die pH-Erhöhung scheint unter den gewählten Testbedingungen eine Auswirkung auf die Calciumaffinität der δ -Untereinheit sowie auf die Konformation des Enzym zu haben. Letzteres wird durch die Erhöhung des $V_{\max}$ -Wertes angedeutet.

Die Aktivierung der A_2 -Aktivität erfolgt bei pH 8.6 bei zehnfach niedrigeren Calciumkonzentrationen als die der A_1 -Aktivierung bei pH 6.8. Die pH-Erhöhung bewirkt bei der Phosphorylase Kinase damit eine höhere Empfindlichkeit gegenüber der Calciumkonzentration, d. h. eine Erhöhung der Calcium-Affinität und zugleich eine drastische Erhöhung der Umsatzgeschwindigkeit. Die Aktivierung der calciumabhängigen A_2 -Aktivität zeigt positive Kooperativität. Diese weist auf die Existenz von mehr als einer Calciumbindungsstelle hin. Tatsächlich sind für die Aktivierung dieser Partialaktivität die Bindung von zwei Ca^{2+} -Ionen an Calmodulin notwendig (15). Diese beiden Ca^{2+} -Bindungsstellen zeigen im Calcium-

Bindungstest positive Kooperativität (15, 16). Der gemessene Hillkoeffizient von 2.4 entspricht dieser Interpretation, was bei einer maximalen Beteiligung von 2×4 (d.h. zwei Bindungsseiten pro Monomer im tetrameren Enzym) Ca^{2+} -Ionen möglich ist.

Auf Grund der Tatsache, daß Calcium kein Substrat der Phosphorylase Kinase ist und die A_2 -Aktivität über einen sigmoidalen Aktivierungsverlauf induziert wird, kann der Hillkoeffizient von 2.4 auch darauf hinweisen, daß die Substratbindungsstellen der Phosphorylase Kinase im Verlauf der calciumabhängigen Aktivierung von A_1 zu A_2 , von einer niedrigen Affinitätsstufe auf eine höhere Affinitätsstufe gehoben werden.

Die Anzahl der Bindungsstellen mit niedriger Affinität und höherer Affinität sind dann im Gleichgewicht entsprechend der herrschenden Calciumkonzentration vorhanden.

Die Calciumbindung ist nachweislich für die Bildung der A_2 -Aktivität bei pH 8.6 verantwortlich. Da bei pH 6.8 aber bei der gleichen Calciumkonzentration nur die A_1 -Aktivität vorliegt, ist für die Induzierung der A_2 -Aktivität die Änderung des pH notwendig. Der pH hat auf die hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen im Protein Einfluß und daher liegt der Schluß nahe, daß das Enzym seine Konformation geändert hat. Diese Konformationsänderung drückt sich in einer Erhöhung der Affinität für Mg^{2+} aus. Die Affinitätserhöhung gegenüber Mg^{2+} ist wiederum Voraussetzung für die Induzierung der calciumspezifischen Bindungsseiten am Calmodulin und damit für die Expression der A_2 -Aktivität. Damit bekommt das Substrat einen optimalen Zugang zum aktiven Zentrum und erreicht eine höhere Affinität und einen sehr viel höheren $V_{\max}$ -Wert.

Offenbar spielt also Mg^{2+} für die Expression der Aktivität eine entscheidende Rolle. In wie weit das Verhalten der beiden Isoenzyme in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration voneinander abweichend ist, ergeben die magnesiumabhängigen Experimente. Von mehreren Autoren (15, 16) wurde gezeigt, daß Calcium- und Magnesiumionen um die Bindungsstellen am Calmodulin einerseits konkurrieren, andererseits synergistisch wirken.

Die A_0 -Aktivität der Phosphorylase Kinase stellt die Grundaktivität dar, die unabhängig von Ca^{2+} ausgedrückt wird (16). Deshalb

lassen sich Effekte des Mg^{2+} auf die katalytische Aktivität unter diesen Bedingungen besonders deutlich erkennen.

Die A_0 -Aktivität des roten Isoenzym wird durch Magnesium etwa zweifach aktiviert, während das weiße Isoenzym fast dreifach aktiviert wird. (Das rote Isoenzym hat einen zweimal größeren K'_m -wert (0.38 mM) als das weiße Isoenzym (0.16 mM)).

Diese Magnesium-Aktivierung wird durch einen Überschuß an Mg^{2+} gehemmt. Die Hemmkonstanten sind für das rote Isoenzym mit 7.9 mM viermal größer als die des weißen Isoenzym (1.8 mM). Das rote Isoenzym wird von Magnesiumionen erst bei höheren Konzentrationen aktiviert und bei niedrigeren als die des weißen Isoenzym gehemmt. Da die δ -Untereinheit bei beiden Isoenzymen gleich zu sein scheint, bleibt der Hinweis, daß das Signal, das durch die Bindung von Magnesiumionen am Calmodulin erfolgt, von beiden Isoenzymen unterschiedlich auf die Aktivität übertragen wird.

Die A_1 -Aktivität spiegelt bei der magnesiumabhängigen Aktivierung das Zusammenspiel von Calcium und Magnesium wieder. Dieses Wechselspiel geht in zwei Phasen vor sich. Die erste aktivierende Phase erfolgt im Bereich bis 10 mM Mg^{2+} . In diesem Bereich werden aktivierende Magnesiumbindungsstellen abgesättigt. Das rote Isoenzym zeigt eine geringere Affinität für Magnesiumionen, erreicht aber gegenüber dem weißen Isoenzym einen größeren V_{max} -Wert (siehe Tabelle 11). Die Konkurrenz von Mg^{2+} mit Ca^{2+} verursacht eine Hemmung, die die zweite Phase der Wirkung des Magnesiums darstellt. Sie macht sich beim roten Isoenzym nicht so stark bemerkbar, da sie erst bei höheren Magnesiumkonzentrationen beginnt als beim weißen Isoenzym.

Die A_2 -Aktivität zeigt Auswirkungen des pH auf die Aktivierung durch Magnesium und dessen Konkurrenz mit Calcium. Der K'_m -Wert des Magnesiums liegt bei beiden Isoenzymen im gleichen Bereich. Calcium ist für die Expression der Aktivität A_1 notwendig, aber nicht hinreichend zur optimalen Ausbildung der Aktivität A_2 .

Das rote Isoenzym hat hier einen niedrigeren V_{max} -Wert (1.13 U/mg) als das weiße Isoenzym (1.74 U/mg). Das hat wohl seinen Grund in der beim roten Isoenzym wesentlich früher einsetzenden Hemmung durch Magnesium. Der Hillkoeffizient ist nur geringfügig größer als 1.0 und deutet deshalb Kooperativität nur an.

Die magnesiumabhängigen Messungen (oben) wurden bei konstanter Ionenstärke durchgeführt. Der Einfluß der Ionenstärke auf das Enzym ist aber nicht zu vernachlässigen, wie die Testserie 3.3.3 zeigt. Graves und Carlson (67) stellten bei ähnlichen Versuchen mit einwertigen Ionen fest, daß die Ionenstärke weniger gegenüber den Substraten, sondern hauptsächlich auf die Phosphorylase Kinase selbst wirkt. Kilimann (16) beobachtete, daß die A_0 -Aktivität der Phosphorylase Kinase kaum durch die Änderung der Ionenstärke beeinflusst wird. Das rote Isoenzym dagegen zeigt mit wachsender Magnesiumkonzentration und Ionenstärke eine deutliche Aktivierung. Es wird, ausgehend von einer Grundaktivität (0.018 U/mg), fast linear auf einen der A_1 -Aktivität nahekommenden $V_{\max}$ -Wert von 0.260 U/mg aktiviert. Das weiße Isoenzym wird dagegen wie beim Test mit konstanter Ionenstärke (3.3.2), leicht aktiviert und anschließend wieder gehemmt. Die außergewöhnliche Aktivierung des roten Isoenzym bei sehr niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen zeigt kooperatives Verhalten. Dieses begleitet anscheinend den Übergang von der Grundaktivität A_0 zur A_1 -Aktivität. Eine schwache Aktivierung des weißen Isoenzym scheint dieses zu bestätigen. Da bisher der Übergang von einer Partialaktivität zur nächsten nur mit Hilfe von Calciumionen induziert wurde (16), ist nun zu erkennen, daß Magnesium mit Hilfe der Ionenstärke diesen Übergang gerade beim roten Isoenzym ebenfalls induzieren kann. Die Ionenstärke sowie der pH haben Einfluß auf die hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen in Proteinen. Den Übergang von der A_0 - zur A_1 -Aktivität kann man daher mit einer Änderung der Konformation des roten Isoenzym erklären.

Singh et al. (28) beobachteten schon bei der Phosphorylase Kinase aus gemischtem Muskel, daß die A_1 -Aktivität durch Magnesiumionen bis zu einer Konzentration von ca. 80 mM aktiviert werden kann. Sie berücksichtigten aber nicht, daß mit wachsender Magnesiumkonzentration die Ionenstärke ebenfalls ansteigt. Der Test mit konstanter Ionenstärke zeigt, daß sich die Phosphorylase Kinase bis etwa 10 mM Mg^{2+} aktivieren läßt; anschließend wird sie gehemmt. Ohne Ausgleich der Ionenstärke wird der gleiche Effekt gemessen, den Singh et al. beobachteten.

Beide Isoenzyme werden unter diesen Bedingungen bis 90 mM Mg^{2+} , ausgehend von einer Grundaktivität, die der A_0 -Aktivität nahe kommt, aktiviert. Der Anstieg der Aktivität mit wachsender Magnesiumkonzentration ist ab etwa 10 mM fast linear, so daß die Berechnung der K'_m - und V_{max} -Werte, die einen hyperbolischen Aktivitätsverlauf voraussetzen, nicht ganz zutreffen. Die magnesiumspezifischen Bindungsstellen der Phosphorylase Kinase sind bis etwa 10 mM Mg^{2+} gesättigt. Daher läßt sich die fast lineare Aktivierung bis ca. 90 mM Mg^{2+} gut mit dem linearen Anstieg der Ionenstärke verbinden. Chan und Graves (68) haben gemessen, inwieweit die Ionenstärke dieses Enzym beeinflussen kann. Sie konnten mit Hilfe höherer Konzentrationen von LiBr (1.2 M) die α - und β -Untereinheit der Phosphorylase Kinase abtrennen. Das läßt den Schluß zu, daß die beiden Untereinheiten über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen mit den restlichen Untereinheiten verbunden sind und darum auf Veränderungen der Ionenstärke besonders empfindlich reagieren. Die anschließende Inhibition demonstriert den kaotropen Effekt hoher Magnesiumkonzentrationen.

Die Abhängigkeit des Magnesiumeinflusses auf die Aktivität der Phosphorylase Kinase vom pH dokumentiert die A_2 -Aktivität. Bei pH 8.6 ist die Aktivität A_2 der Phosphorylase Kinase voll entfaltet. Eine Steigerung ist, nachdem die Calcium- und Magnesiumbindungsstellen gesättigt sind, nicht mehr möglich. Weitere Zugaben von Magnesiumionen inhibieren die Aktivität der Phosphorylase Kinase. Das rote Isoenzym hat, wie bei der A_1 -Aktivität, einen wesentlich größeren V_{max} -Wert, aber einen kleineren K'_m -Wert (siehe Tabelle 10), als das weiße Isoenzym. Die Hemmbarkeit ist wie bei der A_1 -Aktivität zu höheren Magnesiumkonzentrationen hin verschoben.

Den Einfluß der Ionenstärke ohne die Effekte der Mg^{2+} -Ionen sollte ein Test zeigen, in dem die Aktivität der Phosphorylase Kinase in Abhängigkeit von der Ammoniumchloridkonzentration gemessen wurde. Frühere Versuche (67) mit dem Isoenzym der Phosphorylase Kinase aus gemischtem Muskel ergaben entsprechend der Hofmeisterserie (69) eine starke Hemmung des Enzyms (54 %).

Kilimann (16) berichtete, daß die A_0 -Aktivität kaum von der Ionenstärke beeinflusst wird. Der Einfluß der Ionenstärke richtet sich also auch nach dem Aktivitätszustand der Phosphorylase Kinase. Die Messungen der Versuchsreihe 3.3.4 ergeben ebenfalls nur einen geringen Einfluß der Ionenstärke auf die A_0 -Aktivität; beide Isoenzyme werden leicht aktiviert. Das rote Isoenzym wird bei höheren NH_4Cl -Konzentrationen stimuliert, sein V_{max} -Wert ist nur etwa halb so groß und die halbmaximale Inhibition erfolgt erst bei etwa doppelt so großen Ammoniumchloridkonzentrationen wie die des weißen Isoenzym. Die A_0 -Aktivität des roten Isoenzym reagiert also nur schwach auf den Einfluß der Ionenstärke. Die A_1 -Aktivität beider Isoenzyme wird durch NH_4Cl gehemmt und strebt mit zunehmender NH_4Cl -Konzentration der A_0 -Aktivität zu. Dabei zeigt das rote Isoenzym einen zu höheren Konzentrationen hin verschobenen K_1 -Wert. Der stabilisierende Effekt des Magnesiums wird im Hinblick auf den Test 3.3.3 ohne Ausgleich der Ionenstärke besonders deutlich und erklärt gleichzeitig die Inhibition der Aktivität der Phosphorylase Kinase bei höheren Magnesiumkonzentrationen (größer als 90 mM) durch den destabilisierenden Effekt der Ionenstärke.

Die A_2 -Aktivität läßt sich durch die Streuung der Meßwerte im Bereich von 0-100 mM NH_4Cl nur mit einem großen Fehler berechnen. Die Aktivität liegt im Bereich bis 100 mM NH_4Cl im oberen Aktivitätsdrittel und fällt mit ansteigender NH_4Cl -Konzentration bis zu der A_1 -Aktivität ab. Der Verlauf entspricht etwa dem magnesiumabhängigen Test ohne Ausgleich der Ionenstärke (3.3.3).

Wie oben gezeigt werden konnte, unterscheiden sich die beiden Isoenzyme in der Regulation der Aktivität durch Calcium- und Magnesiumionen. Die Übertragung des Signals, das durch die Bindung von Calcium- und/oder Magnesiumionen am Calmodulin ausgelöst wird (14 , 15 , 28), auf die aktiven Zentren der Phosphorylase Kinase sollte dafür verantwortlich sein.

Die bisherige Diskussion bezog sich auf die Effektoren Ca^{2+} , Mg^{2+} und Ionenstärke im einzelnen. Die Wirkungen dieser Effektoren sollen nun kurz zusammenfassend betrachtet werden.

Die A_0 -Aktivität entspricht dem " Grundzustand " der Phosphorylase Kinase, sie ist eine Ausgangsform für alle weiteren Aktivitätsstufen. Das rote Isoenzym besitzt diese A_0 -Aktivität wie das weiße, sie wird nicht von Ammoniumchlorid und Ionenstärke beeinflusst. Magnesiumionen alleine können die A_0 -Aktivität nur wenig stimulieren. Nur die Bindung von Calciumionen ermöglicht der Phosphorylase Kinase den Übergang von der A_0 - zur A_1 -Aktivität. Das rote Isoenzym macht eine Ausnahme. Der Einfluß von Magnesium und Ionenstärke zusammen ermöglicht ihm ebenfalls den Übergang zur A_1 -Aktivität. Dieser Übergang erfolgt erst nachdem das rote Isoenzym mit Magnesium gesättigt ist. Es ist daher anzunehmen, daß erst durch die Bindung des Magnesiums an die δ -Untereinheit das Enzym in den Zustand versetzt wird, in dem die Ionenstärke dieses in Richtung der A_1 -Aktivität beeinflussen kann. Die Ionenstärke allein ist nicht in der Lage, diese Umwandlung zu bewirken.

Wie die calciumabhängige Aktivierung zeigt, wird die A_1 -Aktivität bei beiden Isoenzymen durch die gleichen Calciumkonzentrationen induziert. Die A_1 -Aktivität läßt sich zusätzlich durch Magnesiumionen stimulieren. Das rote Isoenzym weist dabei nur eine halb so große Affinität zum Magnesium auf. Diese und die zu größeren Magnesiumkonzentrationen hin verschobene Inhibition des roten Isoenzymen läßt sich wie folgt erklären:

Einmal kann die Konformation des roten Isoenzymen so verändert sein, daß es die Bindung von Mg^{2+} erst bei größeren Mg^{2+} -Konzentrationen registriert, zum anderen kann die veränderte Konformation des Enzymen solchen Einfluß auf das Calmodulin haben, daß durch die veränderte Bindung der δ -Untereinheit an das Enzym die Affinität zum Magnesium herabgesetzt wird.

Die Wirkung von Calcium- und Magnesiumionen erfolgt über die δ -Untereinheit auf die Phosphorylase Kinase, dagegen erstreckt sich die Wirkung der Ionenstärke auf das gesamte Enzym. Erhöhung der Ionenstärke hemmt die A_1 -Aktivität, aber in Verbindung mit Magnesiumionen kann die Ionenstärke beide Isoenzyme bis 90 mM Mg^{2+} aktivieren. Die Wirkung des Magnesiums über den Sättigungsbereich hinaus läßt sich nur im Hinblick auf die Wirkung der Ionenstärkeerhöhung erklären. Die Ionenstärke allein beeinflusst

die intramolekularen hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen des Enzyms in der Weise, daß es auf das Niveau der A_0 -Aktivität reduziert wird. Ist es aber mit Magnesium gesättigt, wird es durch Änderung der Konformation in " positiver Weise ", d.h. in Richtung auf die A_2 -Aktivität angehoben. Ab 90 mM Mg^{2+} wird die Ionenstärke so groß, daß der kaotrope Effekt des Mg^{2+} vorherrscht.

Die A_2 -Aktivität wird bei beiden Isoenzymen von gleichen Calciumionenkonzentrationen induziert. Durch Magnesiumionen kann die A_2 -Aktivität beider Isoenzyme weiter aktiviert werden. Wird die Magnesiumkonzentration über den Sättigungsbereich (etwa 10 mM) hinaus erhöht, ohne die Ionenstärke auszugleichen, so werden beide Isoenzyme gehemmt. Die A_2 -Aktivität stellt den aktivsten Zustand der Phosphorylase Kinase dar, der durch Ionenstärke oder Phosphorylierung (3.1.4) (25) nur in geringen Grenzen weiter aktiviert werden kann.

Kooperativität kann bei der Ausbildung der A_2 -Aktivität während der Stimulierung durch Calcium, bei der magnesiumabhängigen Stimulierung der A_1 -Aktivität und bei der magnesiumabhängigen Aktivierung der A_0 - und A_1 -Aktivität beobachtet werden. In allen Fällen tritt Kooperativität auf, wenn ein Effektor die Phosphorylase Kinase von der "niedrigen " in die " höhere " Partialaktivität anhebt.

Die Effekte der ionenabhängigen Aktivierung wurden über die Konvertierung der Phosphorylase b zu a gemessen. Inwieweit die Calcium- und Magnesiumkonzentration und der pH-Wert auf die Affinität der Phosphorylase Kinase gegenüber seinen Substraten einwirken, kann bei den substratabhängigen Versuchen beobachtet werden.

Bei dem Substrat ATP/Mg^{2+} werden für beide Isoenzyme gleiche K_m -Werte, im Gegensatz zu den Messungen von Dickneite (31), beobachtet. Das über Calmodulin-Sepharose gereinigte Enzym weist etwa gleiche V_{max} -Werte auf (0.41 U/mg für das weiße und 0.43 U/mg für das rote Isoenzym). Die pH-Erhöhung auf 8.6 ergibt bei beiden Isoenzymen einen dreifach niedrigeren K_m -Wert gegenüber

ATP/Mg²⁺ (1.59 mM für das weiße und 1.43 mM für das rote Isoenzym). Der $V_{\max}$ -Wert des weißen Isoenzyms liegt nun etwa doppelt so hoch wie der des roten Isoenzyms (3.65 U/mg bzw. 1.65 U/mg). Die Erniedrigung des K_m -Wertes und Erhöhung des $V_{\max}$ -Wertes erfolgt apparent positiv kooperativ, ein Effekt der bei pH 6.8 kaum in Erscheinung tritt. Dieses Verhalten bestätigt die Vermutung, daß erst bei pH 8.6 mehr als eine ATP/Mg²⁺-Bindungsstelle (17) für dieses Substrat zugänglich geworden ist, da sonst bei pH 6.8 ebenfalls deutliche Kooperativität zu beobachten wäre. Diese Vermutung spricht dafür, daß durch die pH-Erhöhung eine Konformationsänderung stattfindet. Diese eröffnet dem ATP/Mg²⁺ eine oder mehrere weitere Bindungsstellen. Die Messungen bei pH 8.6 der calciumabhängigen Aktivierung, die beim Erscheinen der A₂-Aktivität Kooperativität der Substratbindungsstellen ergab, könnte damit korreliert werden.

Die Phosphorylase b-abhängigen Meßreihen zeigen den Einfluß der Effektoren Ca²⁺ und Mg²⁺ auf die K_m -Werte der Phosphorylase Kinase für Phosphorylase b. In dieser Beziehung ist es interessant, inwieweit der Effektor Mg²⁺ die aktiven Zentren der Phosphorylase Kinase für Phosphorylase b heterotrop kooperativ beeinflusst. Um diesen Zusammenhang zu verfolgen, wurden die K_m -Wert-Bestimmungen bei drei Mg²⁺-Konzentrationen 0.6 mM, 1.6 mM und 14 mM durchgeführt.

Die Konzentrationen von 0.6 mM Mg²⁺ liegt gerade über dem K'_m -Wert der Mg²⁺-Aktivierung der A₀- und A₂-Aktivität (0.15 mM bzw. 0.53 mM) und etwa bei dem K'_m -Wert der A₁-Aktivität (0.71 mM). Daher wäre bei den Phosphorylase b-abhängigen Messungen eine voll aktivierte A₀-Aktivität, eine gerade eben halbmaximal aktivierte A₁-Aktivität und eine halbmaximal aktivierte A₂-Aktivität zu erwarten.

Die A₀-Aktivität des weißen Isoenzyms hat einen $V_{\max}$ -Wert von 0.06 U/mg, die A₁-Aktivität 0.05 U/mg und die A₂-Aktivität 2.11 U/mg. Die Unterschiede zwischen A₀- und A₁-Aktivität sind beim roten Isoenzym, das eine wesentlich niedrigere Affinität zum Magnesium aufweist, nicht so gravierend. Der $V_{\max}$ -Wert von A₀ beträgt 0.03 U/mg, von A₁ 0.03 U/mg und von A₂ 1.09 U/mg. Die K_m -Werte beider Isoenzyme sind unterschiedlich entsprechend der jeweiligen Partialaktivität (siehe Tabelle 13). Bedingt durch

die Konkurrenz von Calcium mit Magnesium hat das weiße Isoenzym bei A_1 einen niedrigeren $V_{\max}$ -Wert als A_0 , gleichzeitig ist aber die Affinität zur Phosphorylase b gestiegen. Die pH-Änderung ergibt eine Steigerung des $V_{\max}$ -Wertes gegenüber A_1 um den Faktor 30 für das rote Isoenzym und sogar 40 für das weiße Isoenzym. Der K_m -Wert für Phosphorylase b wird aber nur wenig höher im Vergleich zur A_1 -Aktivität. Die Steigerung der Aktivität durch die pH-Erhöhung verursacht möglicherweise eine Konformationsänderung, die unter Umständen weitere ATP/Mg²⁺-Bindungsstellen freisetzt. Im Gegensatz zur Messung der ATP/Mg²⁺-Abhängigkeit läßt sich bei diesen Versuchen zur Phosphorylase b-Abhängigkeit für alle Partialaktivitäten Kooperativität bei der gewählten Mg²⁺-Konzentration feststellen. Das bedeutet, daß bei allen Partialaktivitäten mehr als eine Substratbindungsstelle beteiligt sein kann.

Die Konzentration von 1.6 mM Mg²⁺ liegt zwei bis dreifach über den K'_m -Werten für dieses Ion bei allen Partialaktivitäten beider Isoenzyme. Gegenüber dem Versuch bei 0.6 mM Mg²⁺ haben sich die $V_{\max}$ -Werte aller Aktivitäten deutlich vergrößert. Die A_0 -Aktivität des weißen Isoenzym hat nun einen $V_{\max}$ -Wert von 0.17 U/mg, A_1 von 0.16 U/mg und A_2 von 2.19 U/mg.

Das rote Isoenzym dagegen hat einen $V_{\max}$ -Wert bei A_0 von 0.08 U/mg, A_1 von 0.18 U/mg und A_2 von 2.01 U/mg. Die A_1 -Aktivität des weißen Isoenzym ist nun zwar mehr als dreimal so hoch wie im vorherigen Fall bei 0.6 mM Mg²⁺ (3.3.6.1) aber die A_0 -Aktivität ist ebenfalls größer geworden und ist immer noch etwas größer als die A_1 -Aktivität. Der Unterschied zwischen A_0 - und A_1 -Aktivität ist beim roten Isoenzym besonders deutlich. Die A_2 -Aktivität ist fast gleich mit der des weißen Isoenzym.

Die Staffelung der K_m -Werte für Phosphorylase b ist bei den Partialaktivitäten durch die Erhöhung des Mg²⁺ deutlicher geworden (siehe Tabelle 14). Das rote Isoenzym hat im Hinblick auf die A_1 -Aktivität eine niedrigere Affinität zur Phosphorylase als das weiße Isoenzym. Calciumbindung hat bei beiden Isoenzymen den K_m -Wert für die A_1 -Aktivität gegenüber dem K_m -Wert der A_0 -Aktivität erniedrigt. Die Änderung der Magnesiumkonzentration von 0.6 auf 1.6 mM hat den K_m -Wert für A_1 beim roten Isoenzym erhöht.

Die Erhöhung des pH-Wertes hat bei beiden Isoenzymen den K_m -Wert für die A_2 -Aktivität gegenüber (3.3.6.1) dem vorherigen Experiment bei 0.6 mM Mg^{2+} kaum verändert, nur der V_{max} -Wert des roten Isoenzymen hat sich dem des weißen angeglichen.

Der Hillkoeffizient zeigt bis auf die A_1 -Aktivität des weißen Isoenzymen keine Kooperativität mehr an. Die Affinität zur Phosphorylase b hat sich nicht entscheidend gegenüber der niedrigeren Mg^{2+} -Konzentration geändert, aber die Maximalaktivität hat sich vergrößert. Da nicht anzunehmen ist, daß sich die Zahl der Bindungsstellen für Phosphorylase b verringert hat, haben wahrscheinlich bei 1.6 mM Mg^{2+} alle Bindungsstellen für Phosphorylase b die gleiche Affinität. Das bedeutet wohl, daß Magnesium einen heterotrop positiven kooperativen Effekt auf die Bindung der Phosphorylase b ausübt, indem es die Affinität der Bindungsstellen für das Substrat Phosphorylase b reguliert.

Die Ergebnisse der Messungen bei 0.6 mM Mg^{2+} und 1.6 mM Mg^{2+} wurden mit einem noch nicht vollständig gesättigtem Enzym durchgeführt. Die Messungen bei 14 mM Mg^{2+} ergeben das Bild eines mit Magnesium gesättigten Enzyms.

Die Aktivität A_0 des weißen Isoenzymen hat nun einen V_{max} -Wert von 0.09 U/mg, A_1 von 0.26 U/mg und A_2 von 2.47 U/mg. Die V_{max} -Werte von A_0 und A_1 sind jetzt deutlich unterschiedlich im Gegensatz zu den beiden vorherigen Fällen.

Die V_{max} -Werte des roten Isoenzymen sind für A_0 0.04 U/mg, A_1 0.36 U/mg und A_2 1.92 U/mg. Die V_{max} -Werte von A_0 und A_1 liegen hier etwa zehnfach auseinander. Gegenüber den Messungen bei 1.6 mM Mg^{2+} ist auch beim roten Isoenzym der V_{max} -Wert der A_0 -Aktivität auf Grund der berechneten Inhibitorkonstanten (siehe Tabelle 9) kleiner geworden als bei den niedrigeren Mg^{2+} -Konzentrationen. Dagegen ist der K_m -Wert zur Phosphorylase b erniedrigt. Die Erhöhung der Magnesiumkonzentration senkt die K_m -Werte von A_0 für Phosphorylase b auf ein Drittel des vorher gemessenen Wertes. Der K_m -Wert der A_1 -Aktivität des weißen Isoenzymen wird dagegen größer, der des roten Isoenzymen bleibt etwa gleich. Dagegen sind die K_m -Werte für A_2 bei beiden Isoenzymen gleich groß geblieben und gegenüber den niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen aber um die Hälfte kleiner geworden. Die Tabelle 15

zeigt, daß alle Partialaktivitäten gegenüber Phosphorylase b unterschiedlich charakterisiert werden können.

Als Schlüssel zum Verständnis der Zusammenhänge von Ca^{2+} , Mg^{2+} , Substraten und der Aktivität der Phosphorylase Kinase kann möglicherweise die Kooperativität dienen.

Der Verlauf der Kooperativität während der K_m -Wert Bestimmung für Phosphorylase b bei 0.6 mM, 1.6 mM und 14 mM Mg^{2+} ist aus der Tabelle 17 zu ersehen.

Tabelle 17: Übersicht über die Hillkoeffizienten während der K_m -Wertbestimmung für Phosphorylase b mit unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen

Mg^{2+} (mM)	weisses Isoenzym			rotes Isoenzym			
	A_0	A_1	A_2	A_0	A_1	A_2	
0.6	1.4	1.7	1.8	1.2	1.5	1.8	:
1.6	1.0	1.5	1.0	1.0	1.2	1.1	:
14.0	1.0	0.9	1.2	1.2	1.0	1.0	:

Es ist deutlich zu erkennen, daß bei niedrigen Magnesiumkonzentrationen die Hillkoeffizienten ausgeprägt sind. Der größte Hillkoeffizient beträgt 1.8 und macht daher zwei Phosphorylase b-Bindungsstellen an der Phosphorylase Kinase wahrscheinlich. Zu höheren Mg^{2+} -Konzentrationen hin nimmt dagegen die Kooperativität bei allen Partialaktivitäten ab. Daraus kann man schließen, daß die Kooperativität direkt von der Magnesiumkonzentration abhängt und damit heterotrop ist. Dieses heterotrope Verhalten bedeutet, daß die Steuerung der Affinität des Enzyms Phosphorylase Kinase zur Phosphorylase b durch Magnesiumionen erfolgt, indem es die Affinität der einzelnen Bindungsstellen beeinflusst. Die A_1 -Aktivität beider Isoenzyme zeigt dieses Verhalten besonders deutlich.

Ebenso läßt sich eine Abhängigkeit der Kooperativität - besonders bei niedrigen Magnesiumkonzentrationen - von der Calciumkonzentration feststellen, denn der Hillkoeffizient steigt mit der Zugabe von sättigenden Calciumkonzentrationen (von der A_0 zur A_1 -

Aktivität) an. Eine Erhöhung des Hillkoeffizienten geht mit einer Erniedrigung der Affinität zur Phosphorylase b einher, daher kann Calcium die Phosphorylase Kinase wohl in die nächsthöhere Partialaktivität führen, doch benötigt diese das Magnesium, um die Affinität der Substratbindungsstellen zu erhöhen, was sich in der Abnahme der Hillkoeffizienten mit steigender Magnesiumkonzentration bemerkbar macht.

Als Modell dieser Vorgänge läßt sich das sequenzielle von Koshland (70) anwenden. Das Enzym kann durch Bindung von Calcium die nächsthöhere Partialaktivität erreichen, die aber ohne Magnesiumionen nicht voll ausgedrückt wird. Erst die Bindung von Magnesiumionen befähigt das Enzym, die jeweilige Partialaktivität maximal zu exprimieren. Übergangszustände sind abhängig von der jeweiligen Calcium- und Magnesiumkonzentration möglich.

Versuch zum Aufbau eines Modells

Die bisher gefundenen Daten über die Phosphorylase Kinase und deren Isoenzyme weisen Gemeinsamkeiten auf, die zum Aufbau eines hypothetischen Modells anregen.

Die tetramere Struktur der Phosphorylase Kinase (α , β , γ , δ)₄ wurde von Cohen (13) und Hayakawa (12) beschrieben.

Cohen untersuchte die Phosphorylase Kinase auch elektronenmikroskopisch und stellte fest, daß das Enzym eine H- oder Schmetterlingsform besitzt (74).

Die genaue Funktion der Untereinheiten ist mit Ausnahme der δ -Untereinheit, die als Calcium- und Magnesium-bindende Untereinheit gut charakterisiert ist (15, 16, 63), noch nicht bekannt. Die α - bzw. α' - und β -Untereinheiten können phosphoryliert werden (16, 22, 71). Dadurch wird die Affinität des Enzyms zur Phosphorylase b beeinflußt und die Maximalaktivität um mindestens einen Faktor 10 erhöht. Den gleichen Effekt erreicht man, indem der pH von 6.8 auf 8.6 erhöht wird, oder bei pH 6.8 die Magnesiumkonzentration ohne Ausgleich der Ionenstärke erhöht wird. Da die Aktivität auch durch Phosphorylierung nicht über die maximale Aktivität bei pH 8.6 gesteigert wird (16), liegt es nahe zu vermuten, daß durch diese verschiedenen Einflüsse gleiche Konformationen des Enzyms stabilisiert werden.

Die γ -Untereinheit wurde von Skuster (72) isoliert und als katalytische Untereinheit charakterisiert. Diese bindet auch die δ -Untereinheit wesentlich fester als die α - und β -Untereinheiten, die sich aus dem Holoenzym durch 1 M LiBr abspalten lassen (68).

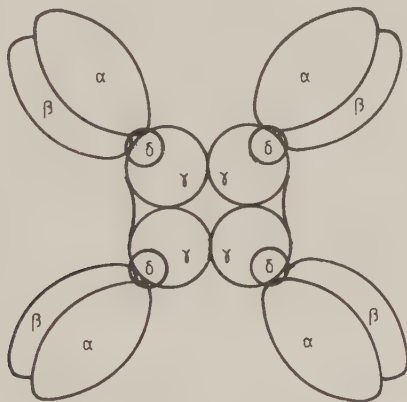
Fischer et al. (17) stellten fest, daß die β -Untereinheit ATP bindet und daher ebenfalls katalytische Eigenschaften haben könnte.

Versucht man alle diese Daten im Hinblick auf die Struktur zu diskutieren, dann kann man sich vorstellen, daß in der H- bzw. Schmetterlingsform die phosphorylierbaren großen α - und β -Untereinheiten herausragende " Flügel " bilden. Dieses Bild wird auch dadurch gestützt, daß diese beiden Untereinheiten durch Prote-

asen leichter angreifbar sind als die γ - und δ -Untereinheiten. Die letzteren könnten geschützt in der Mitte des Moleküls lokalisiert sein. Die γ -Untereinheiten als katalytische Untereinheiten wären von den "Flügeln" α und β eingerahmt, die so die katalytischen Zentren "regulieren" könnten. Die δ -Untereinheiten sind in direktem Kontakt mit der α - und β - bzw. γ -Untereinheit und müssen für Calcium- und Magnesiumionen leicht erreichbar sein.

Bild 34

Hypothetisches Modell der Phosphorylase Kinase



Die Regulation der Aktivität über Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Bindung an der δ -Untereinheit kann nun auf zweierlei Art erfolgen:

Einmal durch "Umklappen" der "Flügel", indem sich die α , β -Untereinheiten dem aktiven Zentrum, ähnlich wie z.B. die Myosin-Köpfchen bei der Muskelkontraktion dem Aktin, zuneigen. Dadurch wäre der Zugang zum katalytischen Zentrum auf der γ -Untereinheit für Phosphorylase b sterisch gehemmt.

Zum anderen kann die δ -Untereinheit die Affinität des aktiven Zen-

trums verändern und dadurch ebenfalls den Umsatz von Phosphorylase b regulieren.

Dieses Modell könnte in folgender Weise mit den drei beobachtbaren Partialaktivitäten (16) korreliert werden.

Die A_0 -Aktivität besitzt bei etwa 10 mM Mg^{2+} eine hohe Affinität zur Phosphorylase b (3.3.6.3), aber einen niedrigen V_{max} -Wert. Hier würden die maximal " zusammengeklappten Flügeluntereinheiten " den Zugang des Substrats an das aktive Zentrum behindern.

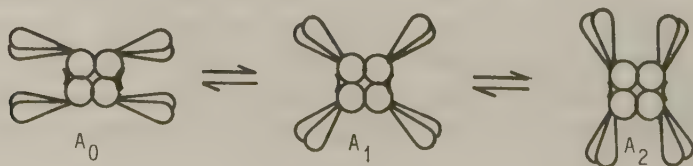
Die A_1 -Aktivität, die dann ausgedrückt wird, wenn die δ -Untereinheit mit Calcium teilweise und mit Magnesium voll abgesättigt ist, ist durch einen Zustand charakterisierbar, bei dem die α , β -Untereinheiten die katalytischen Zentren teilweise freigegeben hätten.

Das Enzym erreicht aber nicht die vollständig " aufgeklappte Form ", die erst die maximale Aktivität A_2 ausdrücken könnte (Bild 35). Die halbgeöffnete Konformation würde die A_1 -Aktivität ausdrücken und eine Art Übergangszustand zwischen dem vollständig " geschlossenen " und vollständig " offenen " Extrem darstellen. Dafür spricht die Beobachtung, daß es keinen bisher bekannten Weg von A_0 zu A_2 gibt, der nicht über A_1 führt.

Verschiedene Ursachen, wie z.B. pH, kovalente Modifikation durch Phosphorylierung, extreme Ionenstärkebedingungen könnten ein vollständiges " Aufklappen " der α , β -Untereinheiten bewirken und damit den ungehinderten Zugang für das Substrat Phosphorylase b ermöglichen. Das Bild 35 zeigt die drei oben beschriebenen möglichen Konformationen, die die drei Partialaktivitäten ausdrücken könnten.

Bild 35

Mögliches Modell für die drei Partialaktivitäten der Phosphorylase Kinase

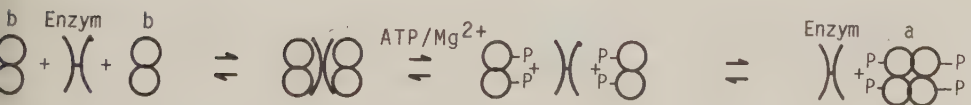


Die drei unterschiedlichen Konformationen erlauben dem Enzym, entsprechend der jeweiligen Form auch andere Proteinsubstrate zu phosphorylieren (25). Die hydrophoben Flächen der α -Untereinheiten können durch derartig bestimmte Konformationen auch unterschiedlich für exogenes Calmodulin erreichbar sein (siehe 3.3.7), was die unterschiedlichen Effekte des exogenen Calmodulins auf die drei Partialaktivitäten verständlich machen könnte.

Auf Grund des oben diskutierten Modells läßt sich ein neuer Reaktionsmechanismus postulieren. Die tetramere Phosphorylase Kinase enthält zwei katalytische Zentren für Phosphorylase b, die auf Grund der gemessenen Hillkoeffizienten vorhanden sein können. Diese könnten zwei Moleküle Phosphorylase b gleichzeitig phosphorylieren, wie es in Übereinstimmung mit der letztens gemachten Beobachtung bei der Phosphorylierung von Troponin, bei dem zwei Phosphorylierungsseiten von der Phosphorylase Kinase gleichzeitig phosphoryliert wurden, nachgewiesen worden ist (73). Die phosphorylierten dimeren Moleküle assoziieren erst dann, nachdem sie vom katalytischen Zentrum abdissoziiert sind, zu einem tetrameren Phosphorylase a-Molekül. (Siehe Bild 36).

Bild 36

Möglicher Reaktionsmechanismus bei der Phosphorylierung der Phosphorylase b durch die Phosphorylase Kinase



b = Phosphorylase b ; a = Phosphorylase a ; Enzym = Phosphorylase Kinase

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß das rote Isoenzym der Phosphorylase Kinase aus rotem Kaninchenskelettmuskel mittels hydrophober Chromatographie, Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration und Affinitätschromatographie auf Calmodulin-Sepharose in elektrophoretisch reiner Form isoliert werden kann. Mit diesem roten Isoenzym wurden verschiedene kinetische Parameter gemessen, die eher Gemeinsamkeiten als Unterschiede gegenüber dem weißen Isoenzym aufweisen:

- 1) Das Produkt Phosphorylase a wird proportional zur eingesetzten Enzymmenge und zur Inkubationszeit gebildet. Aktivierungsphänomene, wie in der Literatur beschrieben, werden nur mit partiell gereinigten Präparaten beobachtet.
- 2) Drei Partialaktivitäten, A_0 , A_1 und A_2 , können anhand der Ca^{2+} -Abhängigkeit für das rote Isoenzym, entsprechend denen des weißen Isoenzym, charakterisiert werden.
- 3) Die halbmaximale Aktivierung des roten Isoenzym durch Mg^{2+} wird erst bei höheren Mg^{2+} -Konzentrationen erreicht als beim weißen Isoenzym.
- 4) Gleichzeitige Erhöhung der Ionenstärke und der Magnesiumkonzentration kann die Partialaktivität A_0 des roten Isoenzym bis auf den Wert der A_1 -Aktivität stimulieren. Dieses gelingt beim weißen Isoenzym nicht. Die A_1 -Aktivität beider Isoenzyme kann bis 90 mM Mg^{2+} stimuliert werden und erreicht möglicherweise als Endwert die A_2 -Aktivität.
- 5) Bei beiden Isoenzymen wird die A_0 -Aktivität durch Ionenstärke kaum beeinflusst, die A_1 -Aktivität mit steigender Ionenstärke gehemmt und die A_2 -Aktivität ebenfalls gehemmt.
- 6) Die K_m -Werte beider Isoenzyme für die Substrate $\text{ATP}/\text{Mg}^{2+}$ und Phosphorylase b weichen nur unwesentlich voneinander ab. Die $V_{\max}$ -Werte der A_0 -Aktivität des roten Isoenzym liegen niedriger und die $V_{\max}$ -Werte der A_1 -Aktivität höher als die des weißen Isoenzym. Die $V_{\max}$ -Werte der A_2 -Aktivität sind bei beiden Isoenzymen etwa gleich.
- 7) Folgende kooperative Phänomene werden durch die allosterischen Effektoren Ca^{2+} und Mg^{2+} hervorgerufen :

a) Der Kurvenverlauf der Calciumaktivierung der A_2 -Aktivität zeigt einen Hillkoeffizienten von 2.4 .

b) Die Stimulierung der A_1 -Aktivität durch Mg^{2+} erfolgt kooperativ. Für das rote Isoenzym wurde ein Hillkoeffizient von 1.4 und für das weiße Isoenzym ein Hillkoeffizient von 2.3 bestimmt.

c) Die Aktivierung der A_0 - und A_1 -Aktivität mit Hilfe der gleichzeitigen Erhöhung von Mg^{2+} und Ionenstärke zeigt Hillkoeffizienten zwischen 1.4 und 2.3 .

8) Messungen der Substratabhängigkeit zeigen homotrope Kooperativität zwischen mindestens zwei oder mehr Bindungsstellen :

a) Die ATP/Mg^{2+} -abhängige Aktivierung der A_2 -Aktivität erfolgt mit einem Hillkoeffizienten von ca. 1.7 bei beiden Isoenzymen.

b) Die Phosphorylase b-abhängige Aktivierung aller drei Partialaktivitäten bei 0.6 mM Mg^{2+} erfolgt bei beiden Isoenzymen mit Hillkoeffizienten zwischen 1.2 und 1.8 .

9) Heterotrope Kooperativität zwischen dem allosterischen Effektor Mg^{2+} und dem Substrat Phosphorylase b konnte für beide Isoenzyme nachgewiesen werden.

Auf Grund der gewonnenen und bekannten Daten wird ein Modell der Phosphorylase Kinase und ihrer Regulation aufgestellt.

6. Literaturverzeichnis

1. Bass, A., Brdiczka, D.,
Eyer, P., Pette, D.,
Eur.J.Biochem., 10, 198, 1968
2. Hoh, J.F.Y., Mc Grath, P.A.
und White, R.I.,
Biochem. J., 157, 87, 1976
3. Jennissen, H.P. und Heilmeyer,
jr. L.M.G.
FEBS Lett., 42, 77, 1974
4. Krebs, E. G., Love, D. S.,
Bratfold, G.E., Trayser, K.A.,
Meyer, W.L. und Fischer, E.H.
Biochemistry, 3, 1022, 1964
5. Drummond, G.I., Harwood, J.R.
und Powell, C.R.
J. Biol.Chem., 244, 4235, 1969
6. Cooper, R.H., Sul, H.S.
Mc Cullough, T.E. und Walsh,
D. A.
J. Biol. Chem., 255, 11794,
7. Ozawa, E.
Biochem. (Tokyo) 71, 321,
8. Chrisman, T.P., Vandenheede,
J.R., Khandelwal, R.L., Gella,
F.J., Clayton, J.D. und Krebs,
E.G.
Adv. Enzymol., 18, 145, 1980
9. Gear, A.R.L. und Schneider, W.
Biochem. Biophys. Acta, 392,
1975
10. Drummond, G.I., Bellward, G.
J. Neurochem., 17, 475, 1970
11. Khoo, J.C.
Biochim. Biophys. Acta, 422,
87, 1976
12. Hayakawa, T., Perkins, J.P.,
Walsh, D.A. und Krebs, E.G.
Biochemistry, 12, 567, 1973
13. Cohen, P.
Eur.J. Biochem., 34, 1, 1973
14. Cohen, P., Burchell, A.,
Foulkes, J.G., Cohen, P.T.W.,
Vanaman, T.C. und Nairn, A.C.
FEBS Lett., 92, 287, 1978
15. Kohse, K.P. und Heilmeyer,
jr. L.M.G.
Eur. J. Biochem., 117, 507,

16. Kilimann, M.W. und Heilmeyer, jr. L.M.G. Biochemistry, 21, 1727, 1982
17. Fischer, E.H., Alaba, J.O., Brautigan, D.L., Kerrick, W.G.L., Malencik, D.A., Moeschler, H.J., Picton, C., Pocingwong, S. Versatility of Proteins (Li, Chon Hao ed.) Proceedings of the Int. Symp. on Proteins, March 6 - 8, 1978. Taipei, Acad. Press, 1978
18. Chan., K.-F.J. und Graves, D.J. J. Biol. Chem., 257, 5948, 1982
19. Fischer, E.H., Blum, H.E., Byers, B., Heizmann, C., Kerrick, G.W., Lehky, P., Malencik, D.A. und Pocinwong, S. Metabolic Interconversion of Enzymes, Arad., Israel (Shaltiel, S., ed.) pp. 1-8 Springer Verlag New York (1975)
20. Picton, C., Klee, C.B. und Cohen, P. Eur. J. Biochem., 111, 553 1980
21. Flockhart, D.A. und Corbin, J.D. Regulatory Mechanismus in the Control of Protein Kinases 1982 CRC Critical Reviews in Biochemistry
22. Cohen, P. und Antoniow, J.F. FEBS Lett., 34, 43, 1973
23. DePaoli-Roach, A.A., Roach, P.J. und Larner, J. J. Biol. Chem., 254, 4212, 1979
24. Ebashi, T.W. und Ebashi, F., J. Biochem. (Tokyo), 69, 441, 1971
25. Kilimann, M.W. und Heilmeyer, jr. L.M.G. Biochemistry, 21, 1735, 1982
26. Hasselbach, W. Molecular Basis of Motility (Heilmeyer, jr. L.M.G., Ruegg, J.C. Wieland, T., ed) Springer Verlag, Berlin - Heidleberg - New York (1976)
27. Handbook of Chemistry and Physics 56th Edition 1975 CRC-Press, Cleveland, OHIO, F 209
28. Singh, T.J., Akatsuka, A. und Huang, K.-P. Arch. Biochem. Biophys., 218, 360, 1982

29. Hörl, W.H., Jennissen, H.P., Gröschel-Stewart, U. und Heilmeyer, jr. L.M.G. Calcium Transport in Contracta and Secretion, Carafoli, E. (Ed. et al.)) North-Holland-Publishing Co. (1975)
30. Steiner, R.F. und Marshall, L. Biochim. Biophys. Acta, 707, 38, 1982
31. Dickneite, G. Diplomarbeit, Abteilung für Biologie, Ruhr-Universität Bochum (1976)
32. Tam, S.W., Sharma, R.K. und Wang, J.H. J. Biol.Chem., 257, 14907, 1982
33. Killilea, S.D. und Ky, N.M. Arch. Biochem. Biophys., 221, 333, 1983
34. Jennissen, H.P. und Heilmeyer, jr. L.M.G. Biochemistry, 14, 754, 1975
35. Krebs, E.G., Kent, A.B. und Fischer, E.H. J. Biol. Chem., 231, 73, 1956
36. Charbonneau, H. und Cormier, M.J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 1039, 1979
37. Fischer, E.H. und Krebs, E.G. J. Biol. Chem., 231, 65, 1956
38. Helmreich, E., Michaelides, M.C. und Cori, C.F. Biochemistry, 6, 3695, 1967
39. Glynn, I.M. und Chappell, J.B. Biochem. J., 90, 147, 1964
40. Cuatrecasas, P. J. Biol. Chem., 245, 3059, 1970
41. Sharma, R.K., Wang, T.H., Wirch, E. und Wang, J.H. J. Biol. Chem., 255, 5916, 1980
42. Sairam, M.R. und Porath, J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 190, 1976
43. Jennissen, H.P. und Heilmeyer, jr. L.M.G. Analytical Biochemistry, 57, 118, 1974
44. Haschke, R.H. und Heilmeyer, jr. L.M.G. Analytical Biochemistry, 47, 451, 1972

45. Haschke, R.H., Heilmeyer, jr. L.M.G., Meyer, F. und Fischer, E.H. J. Biol. Chem., 245, 6657, 1970
46. Mans, R.J. und Novelli, G.D. Arch. Biochem. Biophys., 94, 48, 1961
47. Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L. und Randall, R.L. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951
48. Weber, K. und Osborn, M. J. Biol. Chem., 244, 4406, 1969
49. Portio, M.A. und Pearson, A.M. Biochim. Biophys. Acta, 490, 27, 1977
50. Perrin, D.D. und Sayce, I.G. Talanta, 14, 833, 1967
51. Sillén, L.G. und Martell, A.E. Stability Constants of Metal Ion Complexes, Supplement No.1, Special Publication No. 25, The Chemical Society (1971)
52. Cleland, W.W. Adv. Enzymol., 29, 1, 1967
53. Michaelis, L. und Menten, M.L. Biochem. Z., 49, 333, 1913
54. Wilkinson, G.N. Biochem. J., 80, 324, 1961
55. Lineweaver, H. und Burk, D. J. Amer. Chem. Soc., 56, 658, 1934
56. Gergely, J. persönliche Mitteilung
57. Kalbitzer, H. und Stehlik, D. Z. Naturforschung, 34, 757, 1979
58. Klee, C.B., Crouch, T.H. und Krinks, M.H. Biochemistry, 18, 722, 1979
59. La Porte, D.C., Toscano, W.A. jr. und Storm, D.R. Biochemistry, 18, 2820, 1979
60. Sobue, K., Ichida, S., Yoshida, H., Yamasaki, R. und Kakiuchi, S. FEBS Lett., 99, 199, 1979

61. Schulman, H. und Greengard, P. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 75, 5432, 1978
62. Wang, J.H. und Desai, R. J. Biol. Chem., 252, 4175,
63. Cohen, P. Eur. J. Biochem., 111, 563,
64. Chan, K.-F. J. und Graves, D.J. J. Biol. Chem., 257, 5956,
65. Heilmeyer, jr. L.M.G. persönliche Mitteilung
66. Grand, R.J.A., Shenolikar, S. und Cohen, P. Eur. J. Biochem., 113, 359,
67. Carlson, G.M. und Graves, D.J. Biochemistry, 15, 4476, 1977
68. Chan, K.-F.J. und Graves, D.J. J. Biol. Chem., 257, 5939,
69. Lewin, S. Displacement of Water und I. Control of Biochemical Reactions London, Academic Press (1973)
70. Koshland, D.E.jr., Nemethy, G. und Filmer, D. Biochemistry, 5, 365, 1966
71. Wang, J.H., Stull, J.T., Huang, T.S. und Krebs, E.G. J. Biol. Chem., 251, 4521,
72. Skuster, J.R., Chan, K.-F. J. und Graves, D.J. J. Biol. Chem., 255, 2203,
73. Jaquet, K. Dissertation, Abteilung für Chemie, Ruhr- Universität Bochum, 1983
74. Cohen, P. Current Topics in Cellular Regulation, 14, 117, 1978

7. Anhang

Assoziationskonstanten

Die Assoziationskonstanten sind nach Sillén und Martell (51) angegeben.

Assoziierende Ionen	pK _a - Wert
ATP ⁴⁻ + Ca ²⁺	3.97
ATP ⁴⁻ + Mg ²⁺	4.22
ATP ⁴⁻ + H ⁺	6.53
ATPH ³⁻ + Ca ²⁺	2.13
ATPH ³⁻ + Mg ²⁺	2.24
ATPH ³⁻ + H ⁺	4.06
EGTA ⁴⁻ + Ca ²⁺	11.00
EGTA ⁴⁻ + Mg ²⁺	5.30
EGTA ⁴⁻ + H ⁺	9.46
EGTAH ³⁻ + Ca ²⁺	5.33
EGTAH ³⁻ + Mg ²⁺	3.37
EGTAH ³⁻ + H ⁺	8.85
EGTAH ₂ ²⁻ + H ⁺	2.68
EGTAH ₃ ⁻ + H ⁺	2.00
EDTA ⁴⁻ + Ca ²⁺	10.59
EDTA ⁴⁻ + Mg ²⁺	8.69
EDTA ⁴⁻ + H ⁺	10.27
EDTAH ³⁻ + Ca ²⁺	3.51
EDTAH ³⁻ + Mg ²⁺	2.28
EDTAH ³⁻ + H ⁺	6.16
EDTAH ₂ ²⁻ + H ⁺	2.67
EDTAH ₃ ⁻ + H ⁺	2.00


```

PROGRAM COMICS
CHARACTER*20 KOMP
CHARACTER*7 KOMPLX
DIMENSION C(200),Y1(10),Y2(10),Y3(10),Y4(10),Y5(10),BTOT(10),
1CLTOT(10),TX(10),VX(10),ML(10),ZOC(10),MM(10),ZC(10),MN(200),
1AL(10),200),AM(10),200),AN(200),B(200),E(200),CM(10),ZMPV(10),
3KQSPNR(200),
CHARACTER*100 TEXT
COMMON C,Y1,Y2,Y3,Y4,Y5,BTOT,CLTOT,TX,VX,ML,MN,PN,AL,PM,AN,NL,NP,
1N,B,UX,CPT
6 FORMAT(13,2X,21(1X,12),3X,F6.4,3X,A2C)
8 FORMAT(10F6.4)
9 FORMAT(11X,' TOTAL CONCN. OF METAL(' ,I2,4X) = ,E10.3)
10 FORMAT(11X,25H TOTAL CONCN. OF LIGAND ,I2,4H) = ,E10.3)
11 FORMAT(/13X,2HC1,9X,2HC2,9X,2HC3,9X,2HC4,5X,2HC5,5X,2HC6,5X,
12HC7,9X,2HC8,9X,2HC9,8X,3HC10)
12 FORMAT(I2(12,13))
13 FORMAT(11X,120(' ,'))
17 FORMAT(F10.4,11)
30 FORMAT(/1X,'PH = ',F6.3)
33 FORMAT(/6X,'L1 L2 L3 L4 L5 L6 L7 L8 L9 L0 P1 M2 P3 M4 M5 M6',1X,
1M7 M8 M9 M0 OH LOG BETA COMPLEX SPECIES',/)
34 FORMAT(' FREE METALS, '
35 FORMAT(8X,10(1X,E10.3))
36 FORMAT(' FREE LIGANDS, '
37 FORMAT(' COMPLEX SPECIES, '
43 FORMAT(1X, '13,1H-15,10(1X,E10.3))
1004 FORMAT(' CONC. OF L1,L2,....)
1006 FORMAT(' CONC. OF M1,M2,....)
1005 FORMAT(' PH, INDEX : OH NEXT PH/ 1= NEXT CENC. DATA/ -1= STOP')
1010 FORMAT(/1X,A100)
1001 FORMAT(' COMPLEX-DAT1 : '
2003 FORMAT(A7)
3334 FORMAT(' DATENBLOCK ZU KURZ !',/1X,'NCHPAL DAS GANZE !')
1002 FORMAT(/1X,'CALCULATION OF COMPLESES',/)
3336 OPEN(1,FILE='INPUT',
OPEN(2,FILE='OUTPUT')
OPEN(3,FILE='DRUCKER')
WRITE(2,2001)
READ(1,12003,END=2002) KOMPLX
GOTO 2004
2002 KOMPLX='KOMPLEX'
2004 CLOSE(1)
OPEN(1,FILE='INPUT')
OPEN(4,FILE='KOMPLX')
WRITE(2,1002)
WRITE(3,1002)
REWIND(4)
READ(4,*,END=3335)TEXT
WRITE(2,1010)TEXT
WRITE(3,1010)TEXT
READ(4,*,END=3335)NL,NM,N
WRITE(2,233)
WRITE(3,333)
DO 7 J=1,N
3 READ(4,*,END=3335)(ML(I,J),I=1,NL),(PM(I,J),I=1,NM),PN(I,J),E(J)
*,KOMP
WRITE(3,63),ML(I,J),PM(I,J),I=1,10),(PM(I,J),I=1,10),MN(J),E(J),KOMP
7 WRITE(2,63)J,ML(I,J),I=1,10),(PM(I,J),I=1,10),MN(J),E(J),KOMP
CLOSE(4)
GOTO 106
3333 WRITE(2,3334)
WRITE(3,3334)
CLOSE(1)
OPEN(1,FILE='INPUT')
WRITE(2,1004)
WRITE(2,1006)
READ(1,*,END=3333)(CLTOT(I),I=1,NL)
READ(1,*,END=3333)(BTOT(I),I=1,NM)
WRITE(2,63)
WRITE(2,1010) I,CLTOT(I),I=1,NL)
WRITE(3,63)
WRITE(3,1010)(I,CLTOT(I),I=1,NL)
DO 1000 I=1,NM
WRITE(2,91),BTOT(I)
1000 WRITE(3,91),BTOT(I)
HX=ALOG(10.0)
IPI=1
DO 4 J=1,N
AN(J)=MN(J)
DO 4 I=1,10
AL(I,J)=ML(I,J)
4 AM(I,J)=MM(I,J)
DO 13 I=1,N
13 8(I)=EXP(HX*E(I))
DO 14 I=1,NM
14 Y1(I)=BTOT(I)*0.0003
DO 15 I=1,NL
15 Y3(I)=CLTOT(I)*0.0003
16 WRITE(2,1005)
READ(1,*,END=3333)PH,INDEX
WRITE(2,301PH)
WRITE(3,301PH)
WRITE(2,HX*PH)
WRITE(3,HX*PH)
IF(201,1,18,18,27
18 DO 19 I=1,NM
19 VX(I)=BTOT(I)
DO 20 I=1,NL
DMY(I)=1.0
DO 22 J=1,N
1FM(I,J),J)22,22,200
200 DO 21 K=1,NM
1FM(M(K,J),J)22,21,22,
21 CONTINUE
DM(I)=(EXP(HX*E(J)))*UX**MN(J)
DMY(I)=DMY(I)+DM(I)
22 CONTINUE
DO 23 I=1,NL
23 TX(I)=CLTOT(I)/DMY(I)

```

```

3  BQ(I)=BQ(I)+AM(I,K)*C(K)
   RATIO=BQ(I)/BQ(I)
   VY(I)=VX(I)/SQRT(RATIO)
7  Y2(I)=ABS(BQ(I)-BQCT(I))
   DO 9 I=1,NL
   ALO(I)=TX(I)
   DO 10 K=1,N
10  ALO(I)=ALO(I)+AL(I,K)*C(K)
   RATIO=ALO(I)/CLTOT(I)
   TY(I)=TX(I)/SQRT(RATIO)
9  Y4(I)=ABS(ALO(I)-CLTOT(I))
   IF(NIT-999)11,11,999
11  DO 12 I=1,NM
   IF(Y1(I)-Y2(I))14,12,12
12  CONTINUE
   DO 13 I=1,NL
   IF(Y3(I)-Y4(I))14,13,13
13  CONTINUE
   IPT=IPT+1
   WRITE(2,99)NIT
   WRITE(3,99)NIT
   RETURN
14  DO 16 I=1,NL
16  TX(I)=TY(I)
   DO 17 I=1,NM
17  VX(I)=VY(I)
   GOTO 2
999  WRITE(2,998)
   WRITE(3,998)
   IPT=1
   RETURN
END

```

```

27 CALL CGGS
   WRITE(2,11)
   WRITE(2,34)
   WRITE(2,35)(VX(I),I=1,NM)
   WRITE(2,36)
   WRITE(2,35)(TX(I),I=1,NL)
   WRITE(2,37)
   WRITE(3,11)
   WRITE(3,34)
   WRITE(3,35)(VX(I),I=1,NM)
   WRITE(3,36)
   WRITE(3,35)(TX(I),I=1,NL)
   WRITE(3,37)
   KP=0
40  KP=KP+1
   KN=100*P
   KM=KN-9
   IF(KN-NI41,42,42)
41  WRITE(2,43)KM,KN,LC(I),I=KM,KN)
   WRITE(3,43)KM,KN,LC(I),I=KM,KN)
   GOTO 40
42  WRITE(2,43)KM,N,C(I),I=KM,N)
   WRITE(3,43)KM,N,C(I),I=KM,N)
   IF(INDEXJ31,16,106)
31  CLOSE(1)
   CLOSE(2)
   CLOSE(3)
   STOP 'MATRIX/ ENDE DER DURCHSAGE !!!!!!!!!!!!!'
3335 WRITE(2,3336)
   STOP 'KOMPLEX-DAT1 FEHLT'
END
SUBROUTINE CGGS
  DIMENSION TERM(200),C(200),Y1(10),Y2(10),Y3(10),
  Y4(10),ATOT(10),CLTOT(10),TX(10),VX(10),ALC(10),BD(10),TY(10),
  ZV(10),ML(10,200),MM(16,200),MN(200),AL(10,200),M(16,200),
  3AN(200),B(200)
  COMMON C,Y1,Y2,Y3,Y4,ATOT,CLTOT,TX,VX,ML,MP,MN,AL,
  IAM,AN,NL,NM,N,B,U,X,IPT
  99 FORMAT(' NUMBER OF ITERATIONS = ',I4)
  998 FORMAT(' ITERATION DID NOT CONVERGE. ')
  NIT=0
  DO 1 K=1,N
    1 TERM(K)=B(K)*UX*MM(K)
  2 DO 3 K=1,N
    3 TERM(K)=TERM(K)
    DO 4 K=1,N
      DO 6 J=1,NM
        4 TERM(K)=TERM(K)+VX(J)*MM(J,K)
      DO 5 K=1,N
        DO 15 J=1,NL
          15 TERM(K)=TERM(K)+TX(J)*ML(J,K)
        5 C(K)=TERM(K)
        NIT=NIT+1
        DO 7 I=1,NM
          80(I)=VX(I)
        DO 8 K=1,N

```

[illegible]

C MATRIX SOLUTION SUBROUTINE

```

1003 WRITE(2,1000)
14 READ(1,*,END=3333)NP
  IF(NP-1)99,99,12
12 WRITE(2,1001)
  M=1
  N=2
  P=NP-N
  NL=N+1
  NZ=N+2
  GOTO 2
16 CK=S(1,1)/S(2,1)
  JJ=JJ+1
  WRITE(3,11)JJ
  WRITE(2,11)JJ
  NI=0
  M=2
18 GOTO 2
19 CK=S(2,1)/S(1,1)
  NI=NI+1
  IF(NI-3)2,21,21
21 S2=0
  DO 22 I=1,NP
22 S2=S2+(V(I1)-S(I,1))*A(I1)/(CK+A(I1))*20*(I1)
  S2=S2/P
  S1=SQRT(S2)
  SL=CK/S(1,1)
  VINT=1/S(1,1)
  VK=1/SL
  DO 10 J=2,N1

```

```

DO 7 K=1,N
  7 SS(K)=S(K,I)
DO 8 J=1,N
  DO 8 K=1,N
    A SS(K,J)=S(K,I,J+1)-SS(K,I)*S(I,J+1)/SS(I)
  9 SS(K,I)=S(K,I)*S(K,I)
  IFM-1,16,16,18
  WRITE(2,36)JJ
  WRITE(3,36)JJ
  CLOSE(1)
  CLOSE(2)
  CLOSE(3)
  STOP ' HYPER'
END

```

GOTO 110
3333 WRITE(2,33334)

CLOSE(1)
CLOSE(3)

```
OPEN(1,FILE='INPUT')
110 OPEN(3,FILE='DRUCKER')
```

```
WRITE(2,999)
WRITE(3,999)
```

```
WRITE(2,1000)
READ(1,*+END=3333)AT,NX,INIT
```

```
WRITE(2,100)
DO 2 I=1,NX
```

```
2, READ(1,*,END=333)X(I),Y(I)
   NA=2*NT
```

```
WRITE(2,1002)
READ(1,*,END=3)
```

```

90 CALL SQ
READ(I,*,END=333)(A(I),I=1,N)
WRITE(2,100) S

```

WRITE(2,100)SUM
WRITE(3,100)SUM

WRITE(2,1003)
WRITE(3,1003)

SOLD=SUM
SI=SOLD

QQ=0.6
WRITE(2

```
WRITE(3,460)(A(I),I=1,NA)
```

```
WRITE(2,474)
```

```

211 IF=0
READ(1,*,FNU=3333)JA

```

IF{JA

```
1115 DO 270 JA=1,NA
1116 AOLD=A(JA)
```

MC=0
JA)

CALLSQ
F(SUM-SI)130

0.7469 4.000 1.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000

```

150 QLD(JA)=AOLD
    GOTO 270
    A(JA)=AOLD**2/AL(JA)
    CALL SQ
    IF(SUM-S1)250,250,160
160 A(JA)=AOLD
    QLD(JA)=AOLD
    GOTO 270
250 IF=1
    GOTO 130
270 GOTO 130
    CONTINUE
    IF(IF)300,293,300
293 IF(IQ-EQ,1)Q=-.999
    Q=SQRT(Q)
    GOTO 111
300 CONTINUE
    FD=1
310 DO 320 J=1,NA
    8(J)=A(J)
    DA=A(J)-OLD(J)
320 A(J)=A(J)+FD*DA
    CALL SQ
335 IF(SUM-S1)335,335,340
    IP=1
340 GOTO 350
340 IF(ABS(SUM-S1)-S1/100)350,350,360
350 IF(ABS(SOLD-SUM)-SUM/100)352,352,351
351 S1=SUM
    SOLD=SUM
    GOTO 111
352 WRITE(2,460)(A(J),J=1,NA),SUM
    WRITE(3,460)(A(J),J=1,NA),SUM
    S1=SUM
    SOLD=SUM
    WRITE(2,475)
353 READ(1,*,END=3333)INIT
    IF(INIT)90,111,111
360 DO 370 J=1,NA
370 A(J)=B(J)
    FD=FD/2
    GOTO 110
500 WRITE(2,1004)
    CLOSE(3)
    READ(1,*,END=3333)JN
    IF(JN-EQ,1,J*) GOTO 110
1004 FORMAT(' NAECHSTER DATENSATZ ? (J/N IM STRICH)')
    CLOSE(1)
    CLOSE(2)
    CLOSE(3)
    STOP* FIT *
    END
SUBROUTINE SQ
    DIMENSION X(100),Y(100),A(10),TERM(10)
    COMMON X,Y,A,SUM,NA,NT,NX,NC,INIT,IS,IFC,TERM1
577 FORMAT(3E10,3,2X)
645 FORMAT(1X/,'* CONC *.6X*,* CALC *.7X*,* OBS *')

```

INIT = INIT+1

NC=NC+1

SUM=0

IF(INIT)590,593,590

WRITE(2,645)

WRITE(3,645)

DO 640 I=1,NX

F=0

DO 620 J=1,NT

TERM1(J)=A(2*J-1)* X(I)/(A(2*J)+X(I))

F=F+TERM1(J)

CONTINUE

IF(INIT)622,621,622

WRITE(2,577)X(I),F,Y(I)

D=(F-Y(I))/2

SUM=SUM+D

RETURN

END

583

590

620

621

622

640

```

C ASSAM
PROGRAM ASSAM
INTEGER VAR=OLIM,HVAR
REAL NY
CHARACTER*1 JN
DOUBLE PRECISION FQS,GRI(17),GG(17,17),H(285),HS( 80)
DOUBLE PRECISION SIGMA,FCSC
DOUBLE PRECISION FUNIT,UPOCT
DIMENSION BUH(17),PX(17),AHX(17)
DIMENSION XJX(17)
COMMON/ABL/XJX(17),HJX(17),FQS
COMMON/UP/VAR
COMMON/TT/TNY
COMMON/SKA/LISTE(17),Z(17)
COMMON/HV/HVAR,IND
COMMON/IR/IRR
COMMON/FUN/GENAX,IPROG,ND,PROT( 80),YTCT( 80),ZTOT( 80),
-NY( 80),C( 80),GEM( 80)
3334 FORMAT( ' DATENBLCK ZU KURZ !',/,'X',NOCHMAL DAS GANZE !' )
5001 FORMAT( ' IONENSORTEN-DATENSATZ=ANZ,VARIABLEN-MAX., ITERATIONS=,/
-IX*,ZAHL UND METHODE (MOEGLICH:1,2,3) UND GRESSTES R/C' )
6002 FORMAT( ' SCHRITTEITTE HX FUER METH.1 ' )
6003 FORMAT( ' VARIATIONSGRÖSSE FUER METH.2 ' )
6004 FORMAT( ' LAUFZAHLEN DER ZU VAR. PARAMETER' )
6005 FORMAT( ' PARAM. NI-N4,K1-L4,M1-M4,ALPHA* )
6006 FORMAT( ' GEMICHTUNGEN 1 - N *CANACH IN DIE NAECHSTEN ZEILEN !',
-'/X',R, C,GEM,ION, C,PROT,, C,KOMP. ION 1, C,KOMP. ION2',
WRITE(2,60001)
WRITE(3,60001)
6000 FORMAT(/,'/X',FIT AN SCATCHARD-GLEICHUNG',/,'X',
=MEHRSTUFIGE KOMPETITIVE REAKTION',//)
100 FORMAT(/,'/X',4(',-'),IPROG',8(',-'),NC,7(',-'),VAR,6(',-'),
-O LIM',25(',-'))
102 FORMAT(' NEUER DATENSATZ ? (J/N IM STRING!')
104 FORMAT(17I4)
105 FORMAT(4E10,3)
106 FORMAT( ' UX(1) ',4E10,3)
112 FORMAT(6X,14,6X,14,6X,14,6X,14)
115 FORMAT(1X,14(',-'),ANFANGSWERTE Z(1),3X,13,'. LAUF',21(',-'))
116 FORMAT(1X,18(',-'),BEFIERTE Z(1),4X,13,'. LAUF',21(',-'))
121 FORMAT(1X,14(',-'),SCHRITTEITTE HX(1),21(',-'))
125 FORMAT(' DURCHGANG',15,'---FEHLERQUADRAT',
-SUMME ',E10,3)
302 FORMAT(5E10,3)
303 FORMAT(5E10,3,'. ')
305 FORMAT(/,'/X',14(',-'),MICHTUNG DER MESSWERTE',28(',-'),/)
308 FORMAT(1X,25(F4,2,1X))
309 FORMAT(10F5,2)
405 FORMAT(14)
407 FORMAT(1X,14(',-'),MAX.FUNKTIONSWERT GEWAX',6X,E10,3,11(',-'))
410 FORMAT(/,'/X',NY(1) ',6X,C(1) ',3X,PROT(1) ',3X,
-YTOT(1) ',3X,ZTOT(1) ',/,'X',55(',-'))
411 FORMAT(/,'/X',NY(1) ',6X,C(1) ',/,'X',23(',-'))
412 FORMAT(/,'/X',NY(1) ',6X,C(1) ',/,'X',3X,PROT(1) ',3X,
-YTOT(1) ',/,'X',47(',-'))
413 FORMAT(1X,64(',-'))
414 FORMAT(1X,23(',-'))
415 FORMAT(1X,59(',-'))
416 FORMAT(1X,59(',-'))
417 FORMAT(/,'/X',FEHLERQUADRATSUMME',4X,E10,3,/)
904 FORMAT(1X,14(',-'),IGRA',15,40(',-'))
3081 FORMAT(1X,14(',-'),LISTE ZUM UMRÖHREN DER PARAMETER Z(1) ',
-12(',-'),/)
3083 FORMAT(14X,N1',8X,N2',8X,N3',8X,N4',)
3087 FORMAT(14X,K1',8X,K2',8X,K3',8X,K4',)
3085 FORMAT(14X,L1',8X,L2',8X,L3',8X,L4',)
3088 FORMAT(14X,M1',8X,M2',8X,M3',8X,M4',)
3086 FORMAT(12X,ALPHA')
4032 FORMAT(11H,10I4)
4034 FORMAT(1X,14(',-'),FAKTOR P IM GRADIENTENPOCUS ',E10,3,
-8(',-'))
6013 FORMAT(E10,3)
3084 FORMAT(/,'/15X',STANDARDABWEICHUNG D. MESSPUNKTE',5X,E10,3)
LAUF=0
OPEN(1,FILE='INPUT')
OPEN(2,FILE='OUTPUT')
GOTO 103
3333 WRITE(2,3334)
CLOSE(1)
CLOSE(2)
OPEN(1,FILE='INPUT')
103 OPEN(3,FILE='DRUCKER')
LAUF=LAUF+1
SUM=0.0
WRITE(2,6001)
READ(1,*,END=3333)IPROG,ND,VAR,OLIM,IGRA,GEMAX
WRITE(3,100)
WRITE(3,112) IPROG,ND,VAR,OLIM
WRITE(3,407) GEMAX
WRITE(3,904) IGRA
WRITE(2,6002)
READ(1,*,END=3333)AHX(1),I=1,VAR)
WRITE(3,121)
WRITE(3,105)AHX(1),I=1,VAR)
WRITE(2,6003)
READ(1,*,END=3333)AP
WRITE(3,4034)AP
WRITE(2,6004)
READ(1,*,END=3333)(LISTE(I),I=1,VAR)
WRITE(3,3081)
WRITE(3,3082)(LISTE(I),I=1,VAR)
WRITE(2,6005)
READ(1,*,END=3333)Z(1),I=1,17)
WRITE(2,315) LAUF
WRITE(2,3083)
WRITE(2,105)Z(1),I=1,4)
WRITE(2,3087)
WRITE(2,105)Z(1),I=5,8)
WRITE(2,3085)
WRITE(2,105)Z(1),I=9,12)
WRITE(2,3088)

```

```

READ(1,*,END=333) NY(1),C(1),PROT(1),YTCT(1),ZTCT(1)
WRITE(2,303) NY(1),C(1),PROT(1),YTCT(1),ZTCT(1)
WRITE(3,303) NY(1),C(1),PROT(1),YTCT(1),ZTCT(1)
CONTINUE
204 CONTINUE
WRITE(2,416)
WRITE(3,416)
201 CONTINUE
WRITE(2,413)
WRITE(3,413)
205 CONTINUE
IRR=0
DO 240 I=1,VAR
J=L1STE(I)
BHX(I)=HX(I)
PX(I)=Z(I)
PX(I)=UX(I)
240 CONTINUE
DO 203 I=1,VAR
HX(I)=BHX(I)*UX(I)
203 CONTINUE
VAR=0
FOS=FUNCT(UX)
WRITE(2,418) FOS
WRITE(3,418) FOS
FOSQ=FOS
FMIN=FOS
IRR=2
IWR=2
IWR=1
IWR=1
ING=IGRA
IF (CLIM.EQ.0) GOTG=0+1
404 CONTINUE
FOS=FUNCT(UX)
403 CONTINUE
IF (FOS.GT.FMIN) GOTG 4500
DO 450 I=1,VAR
4501 PX(I)=UX(I)
FMIN=FOS
4500 CONTINUE
4038 CONTINUE
IF (IIN.GE.CLIM) GOTG 4041
IIN=I+1
WRITE(2,106)(UX(I),I=1,VAR)
WRITE(3,106)(UX(I),I=1,VAR)
CALL ABLE(I,VAR,GR,GG)
WRITE(2,125) IIN,ING,FQS
FQS=FOS
SGO=0+0
SGO=0+0
SGR=0+0
DO 4032 I=1,VAR
4032 CONTINUE
SGR=SGR+GR(I)*GR(I)
GOTO (4035+4036+4037), IGRA
4035 CONTINUE
DO 4043 I=1,VAR

```

```

**
PROGRAMM ERSETZT KEINE MESSLNGEN **

```

```

WRITE(2,1051)(Z(I),I=1,16)
WRITE(3,3086)
WRITE(2,105) Z(17)
WRITE(3,6006)
READ(1,*,END=333)(GEW(I),I=1,ND)
G=0
DO 13 K=1,ND
IF(GEW(K).LE.0) G=G+1
13 CONTINUE
IF((ND-G).LT.VAR) THEN
PRINT*,***** DU SPINNER : EIN PROGRAMM ERSETZT KEINE MESSLNGEN **
GOTO 103
ENDIF
WRITE(3,1151)LAUF
WRITE(3,3083)
WRITE(3,1051)(Z(I),I=1,14)
WRITE(3,3087)
WRITE(3,1051)(Z(I),I=5,8)
WRITE(3,3085)
WRITE(3,1051)(Z(I),I=9,12)
WRITE(3,3088)
WRITE(3,1051)(Z(I),I=13,16)
WRITE(3,3086)
WRITE(3,105) Z(17)
WRITE(3,305)
WRITE(3,308)(GEW(I),I=1,ND)
P=AP
DO 500 I=1,VAR
500 HX(I)=AHX(I)
GOTO (1200,1201,1202), IPROG
1200 CONTINUE
WRITE(2,411)
WRITE(3,411)
DO 201 I=1,ND
READ(1,*,END=333) NY(1),C(1)
WRITE(3,303)NY(1),C(1)
WRITE(2,303)NY(1),C(1)
201 CONTINUE
WRITE(2,414)
WRITE(3,414)
GOTO 201
1201 CONTINUE
WRITE(2,413)
WRITE(3,413)
DO 202 I=1,ND
READ(1,*,END=333) NY(1),C(1),PROT(1),YTCT(1)
WRITE(2,303)NY(1),C(1),PROT(1),YTCT(1)
WRITE(3,303)NY(1),C(1),PROT(1),YTCT(1)
202 CONTINUE
WRITE(2,415)
WRITE(3,415)
GOTO 201
1202 CONTINUE
WRITE(2,410)
WRITE(3,410)
DO 204 I=1,ND

```

```

SIGMA=FQS/SUMGEN
SIGMA=DSQRT(SIGMA)
WRITE(2,3084) SIGMA
WRITE(2,3084) SIGMA
DO 4042 I=1,N
J=LISTE(I)
Z(J)=UX(I)
4042 Z(J)=UX(I)
WRITE(2,116) LAUF
WRITE(2,3083)
WRITE(2,105)(Z(I),I=1,4)
WRITE(2,3087)(Z(I),I=5,8)
WRITE(2,105)(Z(I),I=9,12)
WRITE(2,3085)(Z(I),I=13,16)
WRITE(2,3088)(Z(I),I=17)
WRITE(2,105)(Z(I),I=18,21)
WRITE(2,3086)(Z(I),I=22,25)
WRITE(2,105)(Z(I),I=26,29)
WRITE(2,3083)
WRITE(2,105)(Z(I),I=30,33)
WRITE(2,3087)(Z(I),I=34,37)
WRITE(2,105)(Z(I),I=38,41)
WRITE(2,3085)(Z(I),I=42,45)
WRITE(2,105)(Z(I),I=46,49)
WRITE(2,3088)(Z(I),I=50,53)
WRITE(2,105)(Z(I),I=54,57)
WRITE(2,3086)(Z(I),I=58,61)
WRITE(2,102)
WRITE(2,105)(Z(I),I=62,65)
CLOSE(1)
READ(1,*)END=333)JN
IF(JN.EQ.'J')GOTO 103
STOP'ASSAM'
END
BERECHNUNG DER MATRIX DER I.-TEN ABLEITUNG GG
UND DES GRADVEKTORS GR
SUBROUTINE ABLEIT(GG,GR)
DOUBLE PRECISION FQS
DOUBLE PRECISION GT(I),GS(I,17),FO,FP,FM,F2P
DOUBLE PRECISION FUNCT,UPDCT
DIMENSION Y(17)
COMMON/ABL/UX(I),HX(I),FQS
DO 556 I=1,N
DO 555 J=1,N
555 GS(I,J)=0.
556 CONTINUE
DO 666 I=1,N
666 GT(I)=0.
DO 215 I=1,N
215 Y(I)=UX(I)
FO=FQS
DO 216 I=1,N
Y(I)=UX(I)+HX(I)
FP=FUNCT(Y)
Y(I)=UX(I)-HX(I)

```



```

IF(NF,GE,80)NF=80
TE(NF)=NO(1)
TE(NF)=NO(2)
ABNY=ABNY/CE
WRITE(2,877) ABNY,TNY,ABNYC,TNYC,(TE(L),L=1,60)
WRITE(3,877) ABNY,TNY,ABNYC,TNYC,(TE(L),L=1,60)
TE(NF)=NO(3)
TE(NF)=NO(3)
415 CONTINUE
GOTO414
417 CONTINUE
DO 419 I=1,MD
IN0=1
8PROT=PROT(I)
ABNY=NY(I)
AYTOT=YTOT(I)
AZTOT=YTOT(I)
CE=C(I)
CALL SKAT (CE,XU,8PROT,AYTOT,AZTOT)
DIFF=ABNY-TNY
ABWQU=ABWQU+GEK(I)*DIFF*CIFF
IF(HVAR) 419,419,418
419 CONTINUE
IF (1,GT,1) GOTO6015
DO420 K=1,80
TE(K)=NO(3)
6015 CONTINUE
ABNYC=ABNY/CE
TNYC=TNY/CE
NF=ABNYC*FI+1,
NF=TNYC*FI+1,
IF (NFF,GE,80) NFF=80
IF (NF,GE,80) NF=80
TE(NF)=NO(1)
TE(NFF)=NO(2)
WRITE(2,877) ABNY,TNY,ABNYC,TNYC,(TE(L),L=1,60)
WRITE(3,877) ABNY,TNY,ABNYC,TNYC,(TE(L),L=1,60)
TE(NF)=NO(3)
TE(NFF)=NO(3)
418 CONTINUE
GOTO 414
413 CONTINUE
DO 211 I=1,ND
IND=1
CE=C(I)
CALL SKAT(CE,XU)
DIFF=NY(I)-TNY
ABWQU=ABWQU+GEK(I)*DIFF*CIFF
IF(HVAR) 4036,4036,211
CONTINUE
IF (1,GT,1) GOTO6016
DO 6012 K=1,80
TE(K)=NO(3)
6016 CONTINUE
TNYC=TNY/CE
ABNY=NY/CI

```

```

ABNYC=ABNY/CE
NFF=TNY*CF1+1
NFF=ABNY*CF1+1
IF(NFF-GE-80) NFF=80
IF(NF-GE-80) NF=80
TE(NF)=NO(1)
TE(NFF)=NO(2)
WRITE(2,877) ABNY,TNY*ABNYC,TNYC,(TE(K),K=1,80)
WRITE(3,877) ABNY,TNY*ABNYC,TNYC,(TE(K),K=1,80)
TE(NFF)=NO(3)
TE(NF)=NO(3)
211 CONTINUE
414 CONTINUE
415 CONTINUE
222 CONTINUE
422 CONTINUE
FUNC=ABWQ
RETURN
END
C
BERECHNUNG DER THEORETISCHEN WERTE
SUBROUTINE SKAT(CC,ZZ)
INTEGER VAR,CC,ZZ
COMMON/UP/VAR
COMMON/SKA/LISTE(17),Z(17)
COMMON/T/TNY
COMMON/TT/TNY
DO700 I=1,VAR
J=LISTE(I)
700 Z(J)=ZZ(I)
ALP=(Z(8)*CC)*Z(17)
TNY=Z(4)*ALP/(1+ALP)
TNY=TNY+Z(3)*Z(7)*CC/(1+Z(7)*CC)
TNY=TNY+Z(1)*Z(5)*CC/(1+Z(5)*CC)
TNY=TNY+Z(2)*Z(6)*CC/(1+Z(6)*CC)
RETURN
END
BERECHNUNG DER THEOR. WERTE F. VERDÄCHTLING:ITER
SUBROUTINE SKATU (CC,ZZ,CPROT,ABNY,ATYCT)
INTEGER VAR,HVAR
DIMENSION ZZ(17),SYTOT( 80)
COMMON/UP/VAR
COMMON/TT/TNY
COMMON/TKA/LISTE(17),Z(17)
COMMON/HV/HVAR,IND
COMMON/IR/IRR
204 FORMAT(1H '*, KEINE KONVERGENZ',I5)
1257 FORMAT(1H '*,YPREI= ',
+I10.3)
DO700 I=1,VAR
J=LISTE(I)
700 Z(J)=ZZ(I)
IF(IRR-GT-.1) GOTO 9995
BTOT(IND)=SYTOT/(1+CPROT*(Z(1)*Z(5)+Z(2)*Z(10)+
+Z(4)*Z(12)+Z(3)*Z(11)))
9995 XOLD=BTOT(IND)

```

9997 BEGINNER
COMMON/HV/HVAR,IND
1257 FORMAT(1M,'YEREI=','E10.3+3X','ZEREI=','E10.3')
204 FORMAT(1M,' KEINE KONVERGENZ',15)
DO700 I=1,VAR
J=LISTE(I)
700 Z(I,J)=Z(1,I)
IF(IRR-GT-13)GOTO 9995
BYTOT(IND)=AYTOT/(1+CC*PRCT*(Z(1,I)*Z(9)+Z(2)*Z(10)+
-Z(4)*Z(12)+Z(13)*Z(11)))
8ZTOT(IND)=AZTOT/(1+CC*PRCT*(Z(1,I)*Z(13)+Z(12)*Z(14)+
-Z(4)*Z(16)+Z(3)*Z(15)))
9995 CONTINUE
XOLD1=8YTOT(IND)
XOLD2=8ZTOT(IND)
CONTINUE
9997 DO 99 ITER=1,99
ITCON=2
EA=Z(8)*CC+Z(12)*XOLD1+Z(16)*XCLC2
EB=EA*Z(17)
QA=1+*Z(5)*CC+Z(9)*XOLD1+Z(11)*XCLD2
QB=1+*Z(6)*CC+Z(10)*XOLD1+Z(14)*XOLD2
QC=1+*EB
QD=1+*Z(7)*CC+Z(11)*XOLD1+Z(15)*XOLD2
F1=Z(1)*Z(9)*XOLD1/QA+Z(2)*Z(10)*XOLD1/QB+Z(4)*Z(14)*
-Z(12)*XOLD1*EB/EA/QC-(AYTOT-XOLD1)/C*PRCT
F2=Z(1)*Z(13)*XOLD2/QA+Z(2)*Z(14)*XOLD2/CB+Z(4)*Z(15)*XCLD2*
-EB/EA/QC-(AZTOT-XOLD2)/C*PRCT
F2=F2+Z(3)*Z(15)*XOLD2/QC
DF11=1-/C*PRCT*Z(1)*Z(9)*(QA*XOLD1*Z(9)+/(QA*CA)+Z(2)*Z(5)*
-(QB-XOLD1)*Z(10))/(QB*QB)+Z(4)*Z(12)*EB/(EA*EA)*Z(17)
-Z(12)*XOLD1+Z(8)*CC+Z(16)*XOLD2)*QC/(CC*QC)
DF11=DF11+Z(3)*Z(11)*QC/(CD-XCLD1*Z(11))/(QC*CD)
DF22=1-/C*PRCT*Z(1)*Z(13)*(QA-XCLD2*Z(13))/(QA*CA)+Z(2)*Z(8)*
-(QB-XOLD2)*Z(14))/(QB*QB)+Z(4)*Z(16)*EB/(EA*EA)*Z(17)*Z(16)*
-XOLD2+Z(8)*CC+Z(12)*XCLD1)*QC/(QC*CC)
DF22=DF22+Z(3)*Z(15)*QC/(CD-XCLD2*Z(15))/(QC*CD)
DF121=Z(1)*Z(9)*Z(13)/(CA*QA)-Z(2)*Z(10)*Z(14)/(QB*CB)+
-Z(4)*Z(12)*Z(16)*EB/(EA*EA)*Z(17)-QC/(CC*QC)
DF121=DF121-Z(3)*Z(11)*Z(15)/(CD*QD)
DF12=DF121*XCLD1
DF21=DF121*XCLC2
DF21=DF121*XCLC2
DF21=DF121*DF22-DF12*DF21
XKP2=(F2*QDF12-F1*QDF22)/DET
XKP2=(F1*QDF21-F2*QDF11)/DET
XOLD1=XOLD1+XKP1
XOLD2=XOLD2+XKP2
IF(XOLD1-GT-0.)GOTO 9994
XOLD1=(XOLD1-XKP1)/2.
ITCON=1
9994 IF (XOLD2-GT-0.)GOTO 9993
XOLD2=(XOLD2-XKP2)/2.
ITCON=1
9993 CONTINUE

C
BEGINNER DER ITERATIONSSCHLEIFE
DO 99 ITER=1,99
ITCON=2
EA=Z(8)*CC+Z(12)*XOLD
EB=EA*Z(17)
QA=1+0*Z(5)*CC+Z(9)*XOLD
QB=1+0*Z(6)*CC+Z(10)*XOLD
QC=1+0*EB
QD=1+0*Z(7)*CC+Z(11)*XCLD
F1=Z(1)*Z(9)*XCLD/QA+Z(2)*Z(10)*XOLD/QB+Z(4)*Z(12)*
-XOLD*EB/EA/QC-(AYTOT-XOLD)/C*PRCT
F1=F1+Z(3)*Z(11)*XCLD/QD
DF11=1-/C*PRCT*Z(1)*Z(9)*(QA-XCLD*Z(9))/(QA*CA)+Z(2)*Z(5)*
-(QB-XOLD)*Z(10))/(QB*QB)+Z(4)*Z(12)*EB/(EA*EA)*Z(17)*Z(12)*
-XOLD+Z(8)*CC*QC/(CC*QC)
DF11=DF11+Z(3)*Z(11)*QC/(CD-XCLD*Z(11))/(CD*QC)
XKP1=-F1/DF11
XOLD=XOLD+XKP1
C TEST DER GENAUIGKEIT DER LÖSUNGEN UND BEI NEGATIVEM BEFELD
C KREATION EINES NEUEN LÖSUNGSANSATZESFÜR DEN FOLG. LAUF
IF(XOLD-GT-0.)GOTO9994
XOLD=(XOLD-XKP1)/2.
ITCON=1
9994 CONTINUE
GOTO199,9992),ITCON
9992 EPS1=1.5-6*XOLD*XOLD
IF(XKP1-XKP1.LE.EPS1)GOTO9991
99 CONTINUE
1304 IF(HVAR)1304+1304+1305
WRITE(3,204)IND
1305 CONTINUE
XOLD=8YTOT(IND)
9991 IF (HVAR) 9990,9990,9999
WRITE(3,1257)XOLD
9990 WRITE(3,1257)XOLD
8YTOT(IND)=XOLD
9989 EA=Z(9)*CC+Z(12)*XOLD
EB=EA*Z(17)
QA=1+Z(5)*CC+Z(9)*XOLD
QB=1+Z(6)*CC+Z(10)*XOLD
QC=1+*EB
QD=1+Z(7)*CC+Z(11)*XCLD
TNV=Z(1)*Z(13)/QA+Z(2)*Z(14)/QB+Z(4)*Z(8)*EB/EA/QC
TNV=TNV+Z(3)*Z(17)/QD
TNV=INVECC
RETURN
END
C
BERECHNUNG DER THEOR. WERTE FÜR 3 IONENSORTEN:
C NEWTON-REPHON-VERFAHREN
SUBROUTINE SKAIT (CC,Z,C*PRCT,AYTOT,AZTOT)
INTEGER VAR,HVAR
DIMENSION Z2(17),BYTOT(80),8ZTOT(80)
COMMON/SKA/LISTE(17),Z2(17)
COMMON/T/TNY

```

9992 GOTO (99,9992),ITCON
EPS2=1-E-6*XOLD1*XOLD1
IF (XKP1-6*XKP1-LE,EP51-AND,XK2*XKP2-LE,EP52) GOTO 9991
99 CONTINUE
IF (HVAR) 1304,1304,1305
1304 WRITE(2,204) INO
1305 XOLD1=HYTOT(INO)
XOLD2=BZTOT(INO)
9991 IF (HVAR) 9990,9990,9989
9990 WRITE(2,1257)XOLD1,XOLD2
9989 BYTOT(INO)=XOLD1
BZTOT(INO)=XOLD2
EA=Z(18)*CC+Z(12)*XOLD1+Z(16)*XOLD2
QB=EA*Z(17)
QA=1-E-2*(5)*CC+Z(9)*XOLD1+Z(13)*XOLD2
QC=1-E-8
QD=1-E-2*(7)*CC+Z(11)*XOLD1+Z(15)*XOLD2
TNY=Z(11)*Z(5)/QA+Z(2)*Z(6)/QB+Z(8)*Z(8)*Z(7)/QD
TNY=TNY*CC
RETURN
END

```

```

PROGRAM FUBILO (INPUT=10000/1000,OUTPUT=10000/1000,TAP1=INPUT,
TAP2=OUTPUT)
COMMON L,NZ,XMIN,XMAX,YMIN,YMAX,MA,MB,MC,MD,ME
10 FORMAT(IX,'HALLO !',/,'ALX',SCHAETZE,DU WILLST EIN BILD',
/,'ZEICHNEN LASSEN',/,'LY,
/,'MAL SEHEN, WAS ICH FUER DICH TUN KANN')
11 FORMAT(IX,'WIEVIELE KURVEN MOECHTEST DU IN EIN BILD ZEICHNEN?',
/,'ALX',MAXIMAL 5:'),
5 R=MINO 1
WRITE(2,10)
WRITE(2,11)
READ(1,*,END=10000)I
13 FORMAT(IX,'WIE SOLLN DIE AXSEN GEZEICHNET WERDEN?')
18=0
14 FORMAT(IX,'X- UND Y-ACHSE LINEAR: GIB EINE 0 EIN,')
15 FORMAT(IX,'X-ACHSE LOGARITHMISCH, Y-ACHSE LINEAR: GIB EINE 1
/EIN,')
16 FORMAT(IX,'X-ACHSE LINEAR, Y-ACHSE LOGARITHMISCH: GIB EINE 2
/EIN,')
17 FORMAT(IX,'X- UND Y-ACHSE LOGARITHMISCH: GIB EINE 3 EIN,')
18 FORMAT(IX,'GIB DIE GEMENSCHTE ZAHL AN, JETZT:'),
NZ=N+N*18
DO 3 NV=1,NZ
40 FORMAT(IX,'GIB DIE ANZAHL DER DATENPUNKTE FUER BILD',I2,' AN:'),
WRITE(2,40)NV
GOTO(41,42,43,44,45,46)NV
41 READ(1,*,END=10000)MA
GOTO 3
42 READ(1,*,END=10000)MB
GOTO 8
43 READ(1,*,END=10000)MC
GOTO 3
44 READ(1,*,END=10000)MD
GOTO 8
45 READ(1,*,END=10000)ME
GOTO 3
46 READ(1,*,END=10000)MF
8 CONTINUE
WRITE(2,13)
WRITE(2,14)
WRITE(2,15)
WRITE(2,16)
WRITE(2,17)
WRITE(2,18)
READ(1,*,END=10000)L
101 FORMAT(IX,'GIB DEN KLEINSTEN X-WERT AN:'),
102 FORMAT(IX,'GIB DEN GROSSTEN X-WERT AN:'),
103 FORMAT(IX,'GIB DEN KLEINSTEN Y-WERT AN:'),
104 FORMAT(IX,'GIB DEN GROSSTEN Y-WERT AN:'),
WRITE(2,101)
READ(1,*,END=10000)XMIN
WRITE(2,102)
READ(1,*,END=10000)XMAX
WRITE(2,103)
READ(1,*,END=10000)YMIN
WRITE(2,104)

```

```

CALL FA
43 FORMAT(IX,'MCHC EIN GILD ?( JA = 1, NEIN = 0 )')
47 WRITE(2,*)
READ(1,*)NC
IF(NC) 9999, 9999, 5
10000 PRINT*, N
PRINT*, IS
PRINT*, MA
PRINT*, MB
PRINT*, L
PRINT*, XMIN
PRINT*, XMAX
PRINT*, YMIN
PRINT*, YMAX
CLOSE (1)
PAUSE * FEHLER IM PROGRAMM *
OPEN (1)
GOTO 47
9999 REWIND 1
STOP * ABER NUN LGS : *
END

```

C

```

SUBROUTINE FA
COMMON L,NZ,XMIN,XMAX,YMIN,YMAX,MA,MB,NC,MD,MF
REAL X(40),Y(40),CY(40)
CHARACTER #200 TITELA,TXT1,TXT2
1 FORMAT(IX,' GIB DEN TEXT FUER DIE X-ACHSE AN : ')
WRITE(2,*)
READ(1,*,END=10000)TXT1
2 FORMAT(IX,' GIB DEN TEXT FUER DIE Y-ACHSE AN : ')
WRITE(2,*)
READ(1,*,END=10000)TXT2
DC 77 NA=1,NZ
3 FORMAT(IX,' GIB DEN TITEL FUER GILD #17, # AN : ')
WRITE(2,*)NA
READ(1,*,END=10000)TITELA
4 FORMAT(IX,' GIB JIL DATEN IN DATENSATZEN ZU JE 3 ZAHLEN ' //,
' IX, #, X, Y, DY=5 * AUFABWEGUNG - UNTEREINHALDER IN : ')
WRITE(2,*)
GOTO(10,20,30,40,50)NA
10 M= 1A
GOTO 21
20 M= 1B
GOTO 21
30 M= 1C
GOTO 21
40 M= 1D
GOTO 21
50 M= 1E
GOTO 21
60 M= 1F
GOTO 21
70 M= 1G
GOTO 21
80 M= 1H
GOTO 21
90 M= 1I
GOTO 21
10000 CONTINUE
END
1=NA,JB,1) GOTO 31

```

```

6 CALL PLOTS (0,0,5)
CALL NEAPEN (1)
CALL PERASE ( XMIN,XMAX,YMIN,YMAX,L,N,TITELA,TXT1,TXT2)
31 CALL %SPLN (X,Y,DY,1-1,*,1,0,TITELA,TXT1,TXT2)
77 CONTINUE
CALL PLOT (0,0,0,0,999)
GOTO 32
10000 PRINT*,TXT1
PRINT*,TXT2
PRINT*,TITELA
PRINT*, (X(1),Y(1),DY(1),1=1,4A)
82 RETURN
END

```


Lebenslauf

31. 8. 1951 geboren als Sohn der Eheleute Gerhard und Sieglinde Naumann, geb. Hinkel in Leipzig
- 1958 - 1960 Besuch der Grundschule in Leipzig
- 1961 - 1963 Besuch der Grundschule in Hagen
- 1963 - 1971 Besuch des städt. math. nat. Gymnasiums in Hagen-Haspe
Abschluß: Abitur
- 1971 - 1973 Bundeswehr
- Okt. 1973 Aufnahme des Chemie-Studiums an der Ruhr-Universität Bochum
- Okt. 1975 Diplomvorexamen
- Jan. 1979 Diplomhauptexamen
- Jan. 1978
- Jan. 1979 Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für Anorganische und Analytische Chemie der Ruhr-Universität Bochum mit dem Titel:
Charakterisierung von ternären Thallium(I)-chrom(III)-chalkogeniden.
- März 1979
- Okt. 1983 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Physiologische Chemie I der Ruhr-Universität Bochum

